

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA CAMPOS ATHERINO

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DE
EXTRATOS DE *Lafoensia pacari* A.St-Hil. SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA
MAMÁRIO (MCF-7 E MDA-MB-231) E CAPTAÇÃO DE SEUS COMPONENTES
POR CÉLULA TUMORAL E NÃO TUMORAL

CURITIBA

2019

MARIANA CAMPOS ATHERINO

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DE
EXTRATOS DE *Lafoensia pacari* A.St-Hil. SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA
MAMÁRIO (MCF-7 E MDA-MB-231) E CAPTAÇÃO DE SEUS COMPONENTES
POR CÉLULA TUMORAL E NÃO TUMORAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de
Ciências da Saúde, da Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza

CURITIBA

2019

Atherino, Mariana Campos

Investigação da atividade citotóxica e antiproliferativa de extratos de *Lafoensia pacari* A.St-Hil. Sobre células de carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB – 231) e captação de seus componentes por célula tumoral e não tumoral [recurso eletrônico] / Mariana Campos Atherino – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Wesley Maurício de Souza

1. *Lafoensia pacari*. 2. Câncer de mama. 3. Prevenção. 4. Tratamento. 5. Ensaio clonogênico. 6. Citotoxicidade. I. Souza, Wesley Maurício de. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 583.44



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIANA CAMPOS ATHERINO** intitulada: **INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPROLIFERATIVA DE EXTRATOS DE *Lafoensia pacari* A.St-Hil. SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO (MCF7 E MDA-MB-231) E CAPTAÇÃO DE SEUS COMPONENTES POR CÉLULA TUMORAL E NÃO TUMORAL**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Março de 2019.

WESLEY MAURICIO DE SOUZA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ALESSANDRA BECKER FINCO
Avaliador Externo (UFPR /DPB)

RICARDO WAGNER
Avaliador Interno (UFPR)

*Ao meu avô Oswaldo Campos (in memoriam)
pela alegria por todas as minhas conquistas, pelo
amor e por me apoiar durante toda a sua vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus**, por cumprir suas promessas e por guiar o meu caminho, sendo força e luz sempre, porque a Deus nenhuma coisa é impossível!

Aos meus pais **Salete** e **Achyles**, pelo apoio, força e por sempre acreditarem em mim;

À minha irmã **Juliana**, minha companheira desde sempre, confidente, e também colega de laboratório, que me auxiliou muitas tardes e me fez companhia;

A todos os meus amigos e familiares que estiveram dividindo comigo esta etapa, sempre pacientes e compreensivos com a minha ausência, mas cheios de amor!

Ao meu orientador Prof. Dr. **Wesley**, por aceitar este desafio e me apoiar nas minhas escolhas. Também pela orientação e ensinamentos, pela paciência, por confiar em mim;

À Prof. Dra. **Karina** pelo apoio técnico, por idealizar e por compartilhar seus conhecimentos, viabilizando a realização deste trabalho;

À **Cristiane Loiva Reichert** por ceder os extratos, o seu conhecimento e o seu tempo;

À Prof. Tit. **Almeriane** por abrir as portas de seu laboratório permitindo a execução deste trabalho, e também pelo incentivo e por transmitir seus valiosos conhecimentos;

Ao Prof. Tit. **Cid** por apoiar a execução deste projeto, por confiar em mim durante a organização do XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, pela companhia de viagem, conversas e troca de experiência;

Ao Prof. **Roberto Pontarolo** por me receber no CEB viabilizando a realização das análises químicas;

À mestre **Andressa**, minha amiga, que me acolheu desde o primeiro dia e me ensinou tudo o que sei. Obrigada pela paciência, revisões, risadas infinitas, pelo apoio, força e pelo **Elberth**! Outra pessoa a qual tenho que destacar nos meus agradecimentos: pessoa incrível, de grande coração, que foi fundamental para que

essa dissertação tomasse forma, me auxiliando com as metodologias, análises e discussões;

Aos meus colegas de mestrado **Alcindo, Allan, Fernanda, Melissa, Rebeca, Victor**, por segurarem na minha mão e caminharem comigo, sendo força, motivação e apoio;

Ao **peçoal do CEB**, por me acolher e por me dar toda a condição técnica e científica para a realização das análises. Agradecimento especial à **Rebeca** pelo empréstimo dos padrões, ao **Allan** pelo auxílio nas incontáveis horas de cromatografia e ao **Victor**, pela paciência, pelas tardes de SPEs e pela análise no massa;

À Prof. **Andrea** e a todos do **LabNefro**, pelo acolhimento e pela amizade;

À Prof. **Fabiane** e a todos do laboratório de Bioquímica, pela parceria e pela disponibilização dos equipamentos;

Ao **Maurício e Gracinha** da Central Analítica, pela paciência e pela confiança;

À **secretaria e coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, por trabalharem com excelência, visando sempre o melhor para os alunos e orientadores;

A **todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, pessoas as quais eu tive o prazer de partilhar esse período da minha vida;

Aos **servidores terceirizados da UFPR**, principalmente aqueles que sempre com alegria prontamente abriam os portões da universidade, mesmo nos domingos e feriados;

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

“Todos nós somos feitos por outros milhares de pessoas. Cada ser que fez algo de bom para nós, ou nos disse algumas palavras de conforto ou aprovação, influenciou em nossa personalidade e nossos atos. É por isso que elas se transformam em parte de qualquer sucesso nosso”.

George Matthew Adams

RESUMO

A casca do caule de *Lafoensia pacari* vem sendo popularmente utilizada para o tratamento e prevenção do câncer. Este trabalho objetiva investigar o efeito citotóxico/antiproliferativo seletivo de extratos *L. pacari* sobre duas linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), bem como a captação do extrato mais promissor sobre células tumorais e não-tumorais. Os 19 extratos produzidos a partir dos solventes água, metanol, etanol, acetona e combinações entre os mesmos, foram analisados e a similaridade na composição química dos extratos foi evidenciada, demonstrando que estes variam apenas quantitativamente em relação a área dos picos. Vinte substâncias foram identificadas nos extratos, incluindo os taninos hidrolisáveis, ácido elágico e seus derivados glicosilados, saponinas e triterpenos. Os extratos mais promissores quanto a citotoxicidade e seletividade foram selecionados por meio do método da redução do MTT. De maneira geral, a linhagem MDA-MB-231 foi mais sensível aos extratos de *L. pacari* em comparação a MCF-7. Quando comparados entre si, a maior parte dos extratos não apresentou diferença significativa quanto ao efeito avaliado. Apenas o extrato E-2 (metanol:etanol) apresentou seletividade para ambas as linhagens tumorais analisadas visualizadas pelo método do MTT e confirmada pelo ensaio clonogênico, devido a um menor efeito sobre a inibição da capacidade proliferativa das células normais (McCoy). Foi demonstrado que este extrato possui efeito antiproliferativo nas menores concentrações, e indicativo de efeito citotóxico nas mais elevadas, sobre ambas as células tumorais de mama. As correlações composição-efeito evidenciaram substâncias distintas como responsáveis pelo efeito citotóxico/antiproliferativo na CI_{50} das células MDA-MB-231 e MCF-7, destacando ácido elágico e seus derivados, para a primeira, e triterpeno, catequina e saponina para a segunda. Taninos hidrolisáveis mostraram estar correlacionados com o efeito sobre ambas as linhagens tumorais e também com o efeito seletivo, entretanto, foi demonstrado que estas substâncias sofrem hidrólise em ácido elágico quando em contato com meio de cultura em pH neutro. O E-2 foi captado pela célula tumoral (MDA-MB-231), mas não pela célula normal, sendo possível a observação de produtos do metabolismo do ácido elágico no meio de cultura das células tumorais. A capacidade de metabolizar os componentes do extrato E-2 pode estar relacionada com o próprio efeito seletivo dos extratos sobre as células tumorais (MDA-MB-231), uma vez que as células normais (McCoy) parecem não ter a capacidade de produzir e/ou secretar metabólitos do extrato. Este trabalho demonstra que a ação antitumoral dos extratos das cascas de *L. pacari* não deve ser atribuída apenas ao ácido elágico, mas a mistura de outras substâncias presentes no extrato. Conclui-se que a combinação dos solventes metanol e etanol (E-2) foi a mais eficiente para extrair os compostos de *L. pacari* com atividade citotóxica seletiva sobre células de câncer de mama. Estudos futuros são necessários para investigação dos mecanismos de ação e internalização do extrato E-2.

Palavras-chaves: Câncer de mama. Ensaio clonogênico. Citotoxicidade. Elagitaninos. Captação celular.

ABSTRACT

Lafoensia pacari stem bark has been popularly used for cancer treatment and prevention. This work aims study the selective cytotoxic/antiproliferative effect of *L. pacari* extracts over two breast tumour cell lines (MDA-MB-231 e MCF-7) and the tumour and non-tumour extract components uptake. The 19 extracts produced from water, methanol, ethanol, acetone and its combination were analysed and its similarity on chemical composition was evidenced, demonstrating that this extracts vary only quantitatively in peak area. Twenty substances were identified on extracts, including hydrolysable tannins, ellagic acid and its derived glycolylated substances, saponines and triterpenes. The most promising extracts for cytotoxicity and selectivity were selected by MTT method. In general, MDA-MB-231 was more sensitive to the *L. pacari* extracts than MCF-7. When compared to each other, most of the extracts presented no significant difference in the evaluated effect. Only the extract E-2 (methanol:ethanol) presented selective effect for both tumour cell lines, visualized by MTT and confirmed by clonogenic assay due to a lower effect on inhibition of the proliferative capacity of normal cells (McCoy). It has been shown that this extract has antiproliferative effect at the lowest concentrations, and suggestive cytotoxic effect at the highest on both breast tumour cells. The composition-effect correlations showed distinct substances as responsible for the cytotoxic effect on the IC₅₀ of MDA-MB-231 and MCF-7 cells, highlighting ellagic acid and its derived compounds for the first, and triterpene, catechin and saponin for the second. Hydrolysable tannins were shown to be correlated with the effect on both tumour lines and also with the selective effect, however it was demonstrated that these substances undergo hydrolysis in ellagic acid when in contact with culture medium at neutral pH. The extract E-2 was internalized by the tumour cell (MDA-MB-231), but not by the normal cell, being possible the observation of products of the metabolism of ellagic acid in the medium of the tumour cells. The ability to metabolize E-2 extract components may be related to the selective effect of extracts on tumour cells (MDA-MB-231), once normal cells (McCoy) appear to lack the ability to produce and/or secrete extract metabolites. This work suggests that the antitumor action of extracts from *L. pacari* stem bark should not be attributed only to ellagic acid, but to the mixture of other substances present in the extract. It is concluded that the combination of methanol and ethanol (E-2) was the most efficient to extract *L. pacari* compounds with selective cytotoxic activity on breast cancer cells. Future studies are needed to further investigate the mechanisms of action and internalization of the E-2 extract.

Keywords: Breast cancer. Clonogenic assay. Cytotoxicity. Ellagitannins. Cellular uptake.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática dos subtipos de carcinoma ductal invasivo.....	22
Figura 2.	Distribuição geográfica brasileira da espécie <i>Lafoensia pacari</i> A. St.- Hil., Lythraceae.....	28
Figura 3.	Aspectos botânicos de <i>Lafoensia pacari</i> A. St.- Hil.....	30
Figura 4.	Esquema de contagem das células após 72 horas de tratamento...	43
Figura 5.	Perfil cromatográfico obtido por CLAE dos 19 diferentes extratos das cascas do caule de <i>L. pacari</i> , evidenciando a similaridade na composição química qualitativa.....	47
Figura 6.	Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD dos principais picos do extrato E-2 incluindo os taninos hidrolisáveis (TH), catequinas (CAT), ácido elágico (AE) e derivados, saponinas (SAP) e triterpenos (TRI).....	48
Figura 7.	Matriz de correlação de Pearson entre a composição química dos 19 extratos de <i>L. pacari</i> evidenciando os fatores de correlação (r) elevados. A escala de cores expressa a variação do fator de correlação, variando do amarelo (mais correlacionado) para azul escuro (menos correlacionado).....	50
Figura 8.	Porcentagem de células viáveis recuperadas em relação ao controle nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 após 72h de tratamento com extratos de <i>L. pacari</i> , e dois e quatro dias após a retirada do tratamento.....	54
Figura 9.	Número e área (cm ²) das colônias de MCF-7 tratadas com E-2 por 72 horas.....	56
Figura 10.	Número e área (cm ²) das colônias de MDA-MB-231 tratadas com E-2, E-3 e E-4 por 72 horas.....	58
Figura 11.	Comparação entre o efeito dos extratos E-2, E-3 e E-4 em células MDA-MB-231. Perfil de resposta comparativa dos efeitos dos extratos E-2, E-3 e E-4 sobre células MDA-MB-231 em termos de (A) porcentagem do número e (B) área das colônias em relação ao controle.....	59
Figura 12.	Número e área (cm ²) das colônias de McCoy tratadas com E-2, E-3 e E-4 por 72 horas. (A) Número e área total das colônias por poço, tratadas com E-2, E-3 e E-4 nas concentrações entre 2 - 32 µg/mL. (B) Imagens das colônias de McCoy após a coloração com cristal violeta e valores de CI ₅₀ calculados a partir da área das colônias.....	60

Figura 13.	Comparação entre o efeito dos extratos E-2, E-3 e E-4 em células McCoy. Perfil de resposta comparativa dos efeitos dos extratos E-2, E-3 e E-4 sobre células McCoy em termos de porcentagem do número de colônias (A) e área das colônias (B) em relação ao controle.....	61
Figura 14.	Matriz de correlação de Pearson entre os principais compostos identificados dos 19 extratos de <i>L. pacari</i> e o CI_{50} dos extratos calculados pelo método do MTT das linhagens celulares MDA-MB-231, MCF-7 e McCoy, evidenciando os fatores de correlação (r) diretamente proporcionais com a diminuição do CI_{50}	65
Figura 15.	Comparação da área dos picos dos extratos E-2, E-3 e E-4 com potencial efeito de elevar o CI_{50} das células da linhagem McCoy....	66
Figura 16.	Cromatograma do extrato E-2 (100 μ g/mL) incubado em meio de cultura (RPMI 1640) por 2 h.....	68
Figura 17.	Representação da hidrólise dos principais elagitaninos do extrato E-2 de <i>Lafoensia pacari</i> incubado por 2 h em meio de cultura (RPMI 1640, pH 7,4) resultando na formação do ácido hexahidroxidifenico que espontaneamente desidrata formando uma dilactona de ácido gálico estável (ácido elágico).....	69
Figura 18.	Cromatograma obtido por CLAE-DAD dos lisados das células MDA-MB-231 incubados com extrato E-2.....	71
Figura 19.	Cromatograma obtido por CLAE-DAD dos lisados das células McCoy incubados com extrato E-2.....	72
Figura 20.	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos meios de cultura incubados com extrato E-2 100 μ g/mL e células MDA-MB-231.....	74
Figura 21.	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos meios de cultura incubados com E-2 100 μ g/mL e células McCoy.....	75
Figura 22.	Cromatograma obtido por CLAE-DAD do meio de cultura incubado com ácido elágico 100 μ g/mL e células MDA-MB-231 por 6 horas evidenciando a presença do Ácido elágico (1) no meio extracelular e a presença pequeno pico (t_R = 30,5 min) correspondente aos metabólitos (2).....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Panorama químico e farmacológico dos extratos de <i>Lafoensia pacari</i>	31
Tabela 2.	Relação de extratos obtidos com diferentes líquidos extratores pelo método Simplex Centroid Design.....	38
Tabela 3.	Concentração da suspensão de células utilizada no plaqueamento dos ensaios de avaliação do efeito citotóxico e antiproliferativo dos extratos de <i>L. pacari</i>	41
Tabela 4.	Compostos detectados no extrato E-2 por CLAE-MS modo negativo.....	48
Tabela 5.	Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) determinados para os diferentes extratos de <i>L. pacari</i> em linhagens McCoy, MDA-MB-231 e MCF-7 por 72 horas e seus respectivos índices de seletividade.....	51
Tabela 6.	Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) determinados para os extratos E-2, E-3 e E-4 em linhagens McCoy, MDA-MB-231 e MCF-7 pelo ensaio clonogênico e seus respectivos índices de seletividade.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

Abs	– Absorvância;
AE	– Ácido elágico;
CAT	– Catequina;
Cl ₅₀	– Concentração inibitória média (concentração estimada necessária para reduzir em 50% o número de células viáveis);
Conc.	– Concentração;
CLAE-DAD	– Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos;
CLAE-MS	– Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas;
CTRL	– Controle não tratado;
DMSO	– Dimetilsulfóxido;
ER	– Receptor de estrógeno;
EtOH	Etanol;
g	– Grama;
<i>g</i>	– Força G;
h	– Hora;
HCl	– Ácido clorídrico;
HER2	– Fator de crescimento epidermal humano do tipo 2;
INCA	– Instituto Nacional Do Câncer José Alencar Gomes Da Silva;
IS	– Índice de seletividade;
µg	– Micrograma;
MeOH	– Metanol;
min	– Minuto;
mL	– Mililitro;
MTT	– Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio;
m/z	– Relação massa/carga;
NI	– Não identificado;
NCI	– Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos;

PBS	– Solução salina tamponada com fosfatos;
% p/p	– Porcentagem peso por peso;
PR	– Receptor de progesterona;
r	– Fator de correlação de Pearson;
SAP	– Saponinas;
SFB	– Soro fetal bovino;
TH	– Tanino hidrolisáveis;
t _R	– Tempo de retenção;
TRI	– Triterpenos;
TTN	– Tumores triplo negativos;
VF	– Vermelho de fenol;
VN	– Vermelho neutro;
% v/v	– Porcentagem volume por volume.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 CÂNCER – ASPECTOS GERAIS	20
3.2 CÂNCER DE MAMA	21
3.3 TRIAGEM <i>IN VITRO</i> PARA DESCOBERTA DE NOVAS DROGAS	23
3.4 PLANTAS COMO FONTE DE AGENTES ANTINEOPLÁSICOS	27
3.5 <i>Lafoensia pacari</i> A. St. – Hil., LYTHRACEAE	28
3.6 ÁCIDO ELÁGICO, ELAGITANINOS E CÂNCER DE MAMA.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	38
4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS.....	39
4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	40
4.3.1 Cultivo de células	40
4.3.2 Avaliação do potencial citotóxico e antiproliferativo seletivo dos extratos de <i>L. pacari</i>	40
4.3.2.1 Ensaio da viabilidade celular pelo método da redução do sal de tetrazólio (MTT)	40
4.3.2.2 Índice de seletividade	41
4.3.2.3 Ensaio de simples contagem.....	42
4.3.2.4 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico).....	43
4.3.3 Ensaio da captação do extrato	44
4.4 ESTUDO DE CORRELAÇÃO	45
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS	47
5.1.1 Análise de correlação entre os dados de CLAE-DAD da composição química dos 19 extratos de <i>L. pacari</i>	49
5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	50
5.2.1 Avaliação do potencial citotóxico e/ou antiproliferativo dos extratos de <i>L. pacari</i> pelo ensaio da redução do sal MTT	50
5.2.2 Ensaio de simples contagem.....	53
5.2.3 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico).....	55

5.3 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO COMPOSIÇÃO-EFEITO	63
5.4. CAPTAÇÃO DO EXTRATO E-2 PELAS CÉLULAS NORMAL E TUMORAL	67
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
REFERENCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

O câncer está entre as cinco principais causas de morte em todo o mundo (WHO, 2018), sendo considerado dessa forma, um problema de saúde pública. O câncer de mama é o segundo tipo que ocorre com maior frequência na população feminina brasileira, sendo superado apenas pelo câncer de pele não melanoma. Estatísticas indicam um aumento na incidência de carcinoma de mama no Brasil estimando cerca de 59.700 novos casos no biênio de 2018-2019 (INCA, 2017).

Devido à alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica, explicada pela existência de diversos perfis de expressão gênica, os subtipos de câncer de mama evoluem de formas diferentes, refletindo em prognósticos distintos e alvos terapêuticos específicos (CIRQUEIRA et al., 2011). Os modelos *in vitro* mais comuns para estudar os diferentes subtipos de câncer de mama são as células da linhagem MCF-7, que representam os tumores luminal A, e as células da linhagem MDA-MB-231, que representam os tumores triplo negativos (DAI et al., 2017).

O desenvolvimento de resistência dos tumores aos tratamentos existentes leva ao interesse contínuo pela busca e desenvolvimento de novas terapias anticâncer (MUKHERJEE et al., 2001). As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, uma vez que a síntese de moléculas varia de um esqueleto simples a estruturas químicas altamente complexas. Comparando os metabólitos secundários com compostos sintetizados aleatoriamente, os de origem natural são superiores em termos de atividades biológicas e farmacológicas, sendo assim, os produtos naturais tem sido e serão fontes importantes de novos compostos farmacêuticos (LAHLOU, 2013).

Extratos das cascas do caule de *Lafoensia pacari* tem seu uso popular indicado para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer (DE MELO et al., 2011). Marcondes e colaboradores (2014) demonstraram que extrato metanólico de *L. pacari* reduziu a viabilidade de células leucêmicas por induzir apoptose e que o extrato exerce efeito apoptogênico sobre outras linhagens tumorais como Hela, HRT-18 e SH-SY5Y. Reichert e colaboradores (2018) determinaram a composição química do extrato metanólico das cascas de *L. pacari*, e através do fracionamento do mesmo concluíram que o efeito observado sobre as células de câncer colorretal (HRT-18) não foi atribuído à presença de apenas uma substância, mas à mistura dos componentes do extrato, destacando a importância do ácido elágico, seus derivados e dos

elagitaninos. Diversos estudos demonstraram que o ácido elágico e elagitaninos, isolados ou presentes em extratos vegetais exercem efeito sobre a proliferação, ciclo celular e indução de apoptose em células tumorais de mama (DIKMEN et al., 2011; AQIL et al., 2012; WANG et al., 2012; CHEN et al., 2015). Baseado nos resultados desses estudos, uma vez que os compostos mencionados estão presentes nas cascas do caule de *L. pacari*, e na ausência de estudos que relacionam os efeitos de extratos da planta sobre linhagens de carcinoma mamário, o presente trabalho propõe avaliar o efeito citotóxico e antiproliferativo de diferentes extratos da casca do caule de *L. pacari* sobre células de carcinoma de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), a fim de eleger a melhor combinação de solventes extratores, relacionada com a extração de compostos com atividade seletiva e ainda avaliar sua captação em células tumorais e não-tumorais (McCoy).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade citotóxica e antiproliferativa de extratos de *Lafoensia pacari* sobre células de carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231), bem como a captação dos componentes do extrato por células tumoral e não tumoral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição química dos extratos obtidos de *Lafoensia pacari*;
- Avaliar o efeito citotóxico, antiproliferativo e seletivo dos diferentes extratos de *Lafoensia pacari* em células MCF-7, MDA-MB-231 e McCoy, por meio dos métodos da redução do sal MTT, ensaio de contagem e clonogênico, identificando os extratos mais efetivos e seletivos para cada linhagem;
- Correlacionar o efeito citotóxico e antiproliferativo dos diferentes extratos com a composição química dos mesmos;
- Avaliar por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a captação dos componentes do extrato mais promissor para células tumoral e não tumoral.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CÂNCER – ASPECTOS GERAIS

Câncer é o termo utilizado para definir um conjunto de doenças que apresentam em comum, a proliferação desordenada de células. Em todos os tipos de câncer, as células perdem o controle sobre a regulação da divisão celular, e eventualmente, adquirem a capacidade de invadir tecidos e órgãos, espalhando-se para outras regiões do corpo e originando as metástases (NCI, 2015; INCA, 2017).

O acúmulo de mutações no genoma (herdadas ou adquiridas ao longo da vida) conferem habilidades importantes para o crescimento, sobrevivência, comunicação celular e disseminação metastática tumoral (HANAHAAN; WEINBERG, 2011). As mutações que promovem estas habilidades estão relacionadas à ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais, os quais são tratados como grupos de genes que atuam na regulação da proliferação e da morte celular programada (apoptose).

A ativação de oncogenes leva a codificação de proteínas como fatores de crescimento, receptores de fatores crescimento e de proteínas quinase, que se trata de mediadores celulares capazes de estimular, de maneira contínua, a proliferação celular a qual torna-se independente de sinais de crescimento externos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Além disso, a ativação de oncogenes confere à célula tumoral resistência à morte apoptótica, devido ao aumento da expressão de proteínas de sobrevivência como a BCL-2, a qual atua suprimindo proteínas pró-apoptóticas como BAX e BAK, responsáveis pelo rompimento da integridade da membrana externa da mitocôndria e posterior ativação da cascata de proteínas efetoras da apoptose (BERTRAM, 2000; HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

A célula tumoral também pode desenvolver habilidades para escapar de mecanismos que, em condições normais, regulam negativamente a proliferação celular. Normalmente isso está relacionado com a inativação de genes supressores tumorais como, por exemplo, o p53 e o Rb, que quando afetados, deixam de expressar proteínas importantes para a regulação do ciclo celular, perdendo-se consequentemente, o estímulo para apoptose (FETT-CONTE; SALLES, 2002). Muitos tumores como o câncer de mama, pulmão, colorretal, ovário e de próstata, têm

sido associados com a inibição da apoptose, especialmente relacionada com a mutação do gene p53 (EISINGER et al., 1998; GREJARSDOTTIR et al., 1998).

Em relação ao tratamento de neoplasias, diversas estratégias podem ser utilizadas, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, variando de acordo com a extensão da doença e das características do tumor (INCA, 2017). A quimiorresistência tumoral é um problema importante relacionado à terapia com agentes antineoplásicos, uma vez que leva a redução da eficácia do regime de fármacos utilizado, sendo responsável então pelo fracasso do tratamento e/ou pela reincidência da doença (MARTÍNEZ-LACACI et al., 2007; NCI, 2017).

3.2 CÂNCER DE MAMA

O carcinoma de mama origina-se de uma multiplicação anormal, exagerada e desordenada das células do seio (LIMA, 2005). Os sintomas dessa doença incluem a presença de nódulo ou tumor no seio, acompanhado ou não de dor mamária. Podem surgir alterações na pele que recobre a mama, como abaulamentos, retrações ou ainda, a pele adquirir um aspecto semelhante a casca de uma laranja. Além disso, podem surgir nódulos palpáveis na axila (INCA, 2018).

O câncer de mama apresenta diversos subtipos morfológicos. Com relação aos carcinomas invasivos, 80% são ductais, cerca de 10% são lobulares, e os subtipos menos comuns são os carcinomas mucinosos, cribriformes, micropapilares, papilares, tubulares, medulares, metaplásicos e inflamatórios (SANDHU et al., 2010).

Clinicamente, o câncer de mama ductal invasivo pode ser dividido em subtipos distintos, classificados de acordo com a expressão de receptores de estrógeno, progesterona e do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2 (HER2). Assim, molecularmente, os tumores de mama podem ser classificados como: luminal A e B, basalóide ou triplo negativo e HER2 (Figura 1). Os subtipos têm implicações no prognóstico e na terapêutica, onde, geralmente, os tipos de câncer de mama que expressam receptores de hormônio têm um prognóstico mais favorável do que aqueles que possuem amplificação de HER2 ou os triplos negativos (SANDHU et al., 2010; CIRQUEIRA et al., 2011).

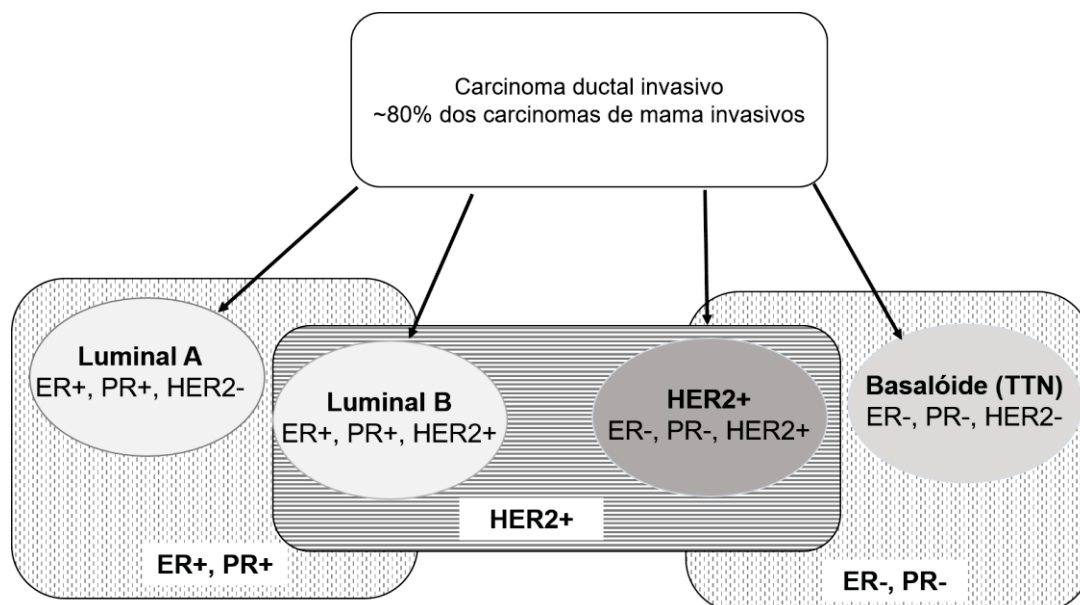


Figura 1. Representação esquemática dos subtipos de carcinoma ductal invasivo. ER: Receptor de estrógeno; PR: Receptor de progesterona, HER2: Fator de crescimento epidermal humano do tipo 2; TTN: Tumores triplo negativos.

FONTE: Adaptado de Sandhu et al. (2010).

Apesar de todos os tipos de tumores poderem ser tratados com quimioterapia, a escolha dos fármacos é diferenciada, dependendo da expressão dos receptores anteriormente citados. Os tumores que expressam receptores hormonais são tratados com agentes que interferem na produção e ação dos hormônios em questão, tais como tamoxifeno e anastrozol. Já os tumores que apresentam HER2, são tratados com trastuzumabe (Herceptin®) ou outros agentes que inibem tal receptor. Tumores triplo negativos (TTN) são tratados apenas com quimioterapia citotóxica, como paclitaxel e doxorrubicina, não existindo uma terapia específica voltada para este tipo de câncer, devido à ausência de marcadores moleculares. Além disso, tumores triplos negativos têm como principal característica o fato de serem mais agressivos e metastáticos quando comparados aos outros subtipos moleculares, apresentando um pior prognóstico (BRENTON et al., 2005; ANDERS; CAREY, 2009).

A maioria dos pacientes com câncer de mama se beneficiam com a quimioterapia. Entretanto, a resistência pode emergir após um período de exposição prolongada (TOY et al., 2013). Além disso, à medida que a duração do tratamento aumenta, a toxicidade e a resistência à terapia tornam-se mais evidentes (RIBEIRO, et al., 2011). Isso faz que a busca por novas drogas citotóxicas com maior eficácia e tolerabilidade seja contínua.

3.3 TRIAGEM *IN VITRO* PARA DESCOBERTA DE NOVAS DROGAS

Os ensaios *in vitro* são amplamente utilizados para triagem de substâncias, especialmente de extratos de origem vegetal e compostos ativos isolados de plantas, visando identificar componentes com potencial uso como produtos farmacêuticos, principalmente na busca por novas drogas anticâncer (RISS et al., 2011). Estes ensaios possibilitam avaliar o potencial tóxico de derivados de produtos naturais frente a diferentes linhagens tumorais sob diversos aspectos, em um curto período de tempo, utilizando quantidades reduzidas de amostra (McGAHON et al., 1995).

Diversos são os métodos descritos na literatura para esta finalidade, muitos deles baseiam-se na avaliação da redução de biomassa, ou viabilidade para determinar a citotoxicidade utilizando um grande número inicial de células e um tempo relativamente curto de exposição/incubação (1-3 dias), sendo método da redução do sal MTT é o mais utilizado (BOYD, 1997). Este método é adequado para avaliação da viabilidade celular em larga escala, utilizado na triagem de grande quantidade de amostras empregando diversas linhagens celulares. O MTT é um método colorimétrico que avalia a viabilidade celular indiretamente, uma vez que o sal de tetrazólio é reduzido pelas células viáveis a formazan, um precipitado de coloração roxa, que é solubilizado formando uma solução uniforme a qual tem a absorbância mensurada. O produto colorido é diretamente proporcional ao número de células viáveis (RISS et al., 2011). Apesar de ser fácil de realizar, não apresentar restrições quanto ao tipo de célula, ser ideal para células aderentes por ser realizado em microplacas e ser considerado padrão ouro dos ensaios de citotoxicidade, o método do MTT também possui algumas limitações. Estas estão principalmente relacionadas com o fato da redução dos sais de tetrazólio ser dependente da taxa metabólica e do número de mitocôndrias presentes na célula. Variações nestes parâmetros podem alterar o resultado do ensaio. Ainda, por ser tóxico à célula, não é possível determinar a atividade da substância testada em vários pontos de tempo com apenas um ensaio e pelo produto da reação ser insolúvel, a etapa de solubilização se faz necessária antes da leitura (BOYD, 1997).

Além do MTT, outros métodos espectrofotométricos podem ser utilizados para células suspensas ou aderentes, como a redução da resazurina e a captação do vermelho neutro (VN). O método da redução da resazurina (conhecido comercialmente como Alamar Blue), se baseia na capacidade das células viáveis de

oxidar o corante azul (resazurina) formando um corante rosa fluorescente (resorufina). Esta reação é enzimática, e acredita-se que seja realizada por enzimas do tipo redutase e diaforase presentes tanto na mitocôndria como no citoplasma. Este método é vantajoso por envolver poucas etapas, pois elimina a etapa de solubilização, uma vez que tanto a resazurina como a resorufina formada são solúveis no meio de cultura e atravessam livremente a membrana. Além disso, estes compostos normalmente não reagem com produtos naturais, não são tóxicos para as células, possibilitando a combinação de ensaios e o ensaio apresenta resultados compatíveis com os obtidos pelo MTT. Entretanto, assim como no ensaio de MTT, por depender da conversão enzimática, apresenta os mesmos problemas já mencionados. Como desvantagens, pode-se citar que o método colorimétrico é menos sensível do que quando feito por fluorescência e, portanto, necessita da leitura da absorvância em dois comprimentos de onda diferentes. Isso reflete nos cálculos para a determinação da atividade citotóxica, sendo estes mais elaborados que para o ensaio de MTT (McGAHON et al., 1995; O'BRIEN et al., 2000). Diferentemente dos ensaios citados anteriormente, a captação do vermelho neutro (VN) se baseia na capacidade do corante vermelho neutro (hidrocloreto de 3-amino-7-dimetil-amino-2-metil-fenazina) de ser preferencialmente absorvido pelos lisossomos. As células viáveis são mensuradas partindo-se do princípio de que um composto citotóxico independente do seu mecanismo de ação interfere na captação lisossomal normal, portanto, apenas células viáveis possuem lisossomos intactos, e capazes de captar o corante vermelho neutro. Então a quantidade de VN captada, proporcional à quantidade de células viáveis e o grau de inibição da viabilidade celular causada pelo composto pode ser mensurado. Uma das vantagens deste método sobre os citados anteriormente, é o fato deste não envolver conversão enzimática. Ainda, quando combinado com os resultados obtidos por outros métodos, pode ser utilizado para avaliação de processos autofágicos. A incorporação do VN depende da capacidade que a célula em manter o gradiente de pH por meio da produção de ATP. A precipitação no VN pode ser citada como uma desvantagem, por afetar a acurácia dos resultados da leitura da absorvância. Processos de autofagia, também interferem nos resultados, uma vez que estão diretamente relacionados com os lisossomos e, portanto, levam a um aumento da quantidade de vermelho neutro incorporada pela célula (McGAHON et al., 1995; REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Ensaio *in vitro* que empregam densidades reduzidas de células inoculadas inicialmente (algumas centenas de células por poço), avaliadas por um período de tempo maior, permitem observar se o tratamento é capaz de causar resistência ou se as células apresentam algum efeito pós tratamento. Para isto, são realizados ensaios de formação de colônia (clonogênico), no qual o efeito da substância teste é avaliada por meio da manutenção da capacidade proliferativa da célula, formando colônias, denominado de potencial clonogênico. Este tipo de abordagem avalia os efeitos das substâncias teste a longo prazo, podendo o ensaio ser realizado por semanas. Outra vantagem deste tipo de abordagem é que o ensaio clonogênico também permite avaliar a sensibilidade das células frente ao tratamento proposto (FRANKEN et al., 2006). Estes ensaios oferecem a vantagem de favorecer a detecção de efeitos antiproliferativos, diferenciando do efeito citotóxico (BOYD, 1997). Desta maneira, o ensaio clonogênico é mais vantajoso que os testes de avaliação da viabilidade celular baseados em parâmetros bioquímicos ou atividade metabólica, como o MTT, os quais não discriminam o tipo de efeito da substância teste sobre as células.

Experimentos desenhados utilizando curvas concentração-resposta fornecem a informação do CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% das células viáveis) e podem ser realizados tanto com células tumorais como com células não tumorais, possibilitando avaliar a seletividade da substância testada ao comparar valores de CI_{50} entre ambas (não tumorais x tumorais). A ausência de seletividade no efeito citotóxico entre linhagens celulares cancerosas e não-cancerosas minimiza a perspectiva de que, por exemplo, plantas estudadas, contenham compostos que possam servir como novos medicamentos antineoplásicos. Ou seja, este tipo de análise fornece pistas para continuar a pesquisa com extratos ou substâncias promissoras que podem ser fontes de compostos biologicamente ativos interessantes e terapeuticamente úteis com excelente atividade sobre células tumorais e baixa toxicidade para células normais (McGAHON et al., 1995).

O uso de linhagens celulares oferece diversas vantagens técnicas, como conhecimento estabelecido do genoma e proteoma das linhagens celulares, reprodutibilidade dos experimentos entre laboratórios devido ao controle das condições ambientais, padronização das condições de cultura e custo menor comparado ao trabalho com modelos animais (BANA; BAGREL, 2011).

O cultivo celular de células tumorais de mama *in vitro* vem sendo uma importante ferramenta de estudo, por permitir avaliar similaridades e diferenças entre

diferentes linhagens celulares com facilidade. A heterogeneidade genômica e biológica do sistema de linhagens celulares também são frequentemente utilizadas para identificar características moleculares que predizem ou indicam resposta, ou a falta dela, frente a agentes terapêuticos sobre vias de sinalização biológicas (BANA; BAGREL, 2011; HOLLIDAY; SPEIRS, 2011).

MCF-7 é a linhagem celular de câncer de mama mais estudada no mundo. Até o ano de 2015 esta linhagem foi utilizada em cerca de 25000 trabalhos científicos. Uma das maiores contribuições destas células para as pesquisas no câncer de mama, tem sido a possibilidade de estudar os receptores de estrógeno (ER), expressos por essa linhagem, mimetizando a maioria dos tumores mamários invasivos, que expressam ER. Ainda, a linhagem é muito utilizada por refletir fielmente diversos aspectos clínicos do câncer de mama, particularmente o manejo de mulheres na pós-menopausa com câncer de mama hormônio-receptor positivo (LEE et al., 2015). Uma vez que essas células expressam receptores de estrógeno e de progesterona, e não amplificam HER2, pode ser classificada como luminal A (DAI et al., 2017).

As células da linhagem MDA-MB-231 não expressam receptores de estrógeno e progesterona, e não amplificam HER2, portanto, são classificadas como subtipo triplo negativo (basalóide) e está entre as linhagens de carcinoma de mama triplo negativo mais comumente utilizadas em estudos científicos. Visto que cerca de 10 a 15% de todos os casos de câncer de mama são classificados como triplo negativos, e esses são os pacientes que apresentam pior prognóstico comparado aos outros subtipos de câncer de mama, o estudo dos TTNs e do desenvolvimento de novas terapias é de extrema importância (CHAVEZ; GARIMELLA; LIPKOWITZ, 2010).

Segundo Dai e colaboradores (2017) as diferentes linhagens celulares de carcinoma de mama, devido às suas particularidades morfológicas e moleculares refletem a classificação dos tumores de mama. Os autores traçam um paralelo comparativo entre prognóstico e agressividade das linhagens celulares classificadas em subtipos e sugerem que tanto os tumores como as linhagens celulares do subtipo luminal (como exemplo da MCF-7) são menos agressivas que os tumores e células triplo negativas (MDA-MB-231).

3.4 PLANTAS COMO FONTE DE AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

Dada a diversidade insondável da natureza, os produtos naturais são uma importante fonte de compostos biologicamente ativos, especialmente nas áreas de doenças infecciosas e terapia antitumoral, devido à complexidade química das substâncias (SONG et al., 2014).

Dentre os fármacos obtidos de plantas utilizados na clínica para o tratamento do câncer, destacam-se os alcaloides da *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), como os dímeros vincristina e vimblastina e da *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), como o paclitaxel, que atuam como inibidores do fuso mitótico. Estes alcaloides exercem efeito antitumoral significativo e são de grande utilidade no tratamento do câncer de mama, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário, testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (SOUZA, 2004; HOLANDA et al., 2008; BRANDÃO et al., 2010).

Segundo Casanova e Costa (2017), nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Particularmente, em relação a atividade antitumoral de produtos naturais, Konan et al. (2012) relataram a citotoxicidade de flavonoides naturais frente a linhagens de células relacionadas a tumores agressivos.

Estudos têm indicado que substâncias pertencentes a diversas classes de metabólitos secundários como alcaloides, saponinas, triterpenos, flavonoides e polissacarídeos apresentam atividade antitumoral. Esta pode ser devido à propriedade destes compostos em regular funções como o sistema imune, apoptose, autofagia, ou ainda, inibir a proliferação celular (RAYAN; RAIYN; FALAH, 2017).

Neste contexto, plantas vem sendo fontes de compostos anticâncer clinicamente relevantes, entre elas, a *Lafoensia pacari* vem ocupando um importante espaço dentro do repertório de produtos naturais estudados como potenciais agentes antineoplásicos, devido ao uso popular como antiinflamatório e no tratamento e prevenção do câncer, além dos estudos prévios utilizando linhagens celulares tumorais, os quais atribuem o efeito ao ácido elágico e a elagitatinos (REICHERT et al., 2018).

obtusas, margens inteiras e onduladas, nervuras salientes na face inferior, nervuras secundárias quase paralelas, pecíolos de até 1 cm de comprimento, folhas coriáceas, glabras discolores, brilhantes na face superior (Figura 3-D) (FIRMO et al., 2016). As flores são grandes com receptáculo desenvolvido de até 8 cm de diâmetro com até 16 pétalas livres de cor branca ou amarelada (Figura 3-E). De coloração avermelhada por fora, margem reclinada e doze dentes fortes, o cálice apresenta forma de dedal, de onde advém seu nome popular. Apesar de belas, as flores de *L. pacari* apresentam odor desagradável com intensidade que varia de acordo com o estágio de abertura da flor. Sua polinização é comumente realizada por morcegos, mariposas e abelhas (FIRMO et al., 2016; GALVÃO, 2017). O fruto é seco, deiscente do tipo cápsula semilenhosa, semiglobosa, com 4 a 8 cm de comprimento por 2,3 a 5,3 cm de diâmetro, com ápice arredondado, terminando em cone (BATISTA, 2008; SANTOS, 2006). A espécie apresenta frutos secos no formato semelhante à de um pião, com 4 a 8 cm de comprimento, 2,3 a 5,3 cm de diâmetro (Figura 3-F). Quando maduros, os frutos se abrem pela ruptura irregular das paredes do opérculo que se desprendem, na base, liberando em média 72 sementes que são dispersas pelo vento (BARREIRA et al., 2000; FERNANDES et al., 2012; GALVÃO, 2017; MUNDO; DUARTE, 2007). As sementes possuem coloração amarela a parda-avermelhada e estão dispostas em forma de roseta, medindo aproximadamente 1,96 cm de comprimento, 0,74 cm de largura e 0,04 cm de espessura (BARREIRA et al., 2000; FERNANDES et al., 2012).

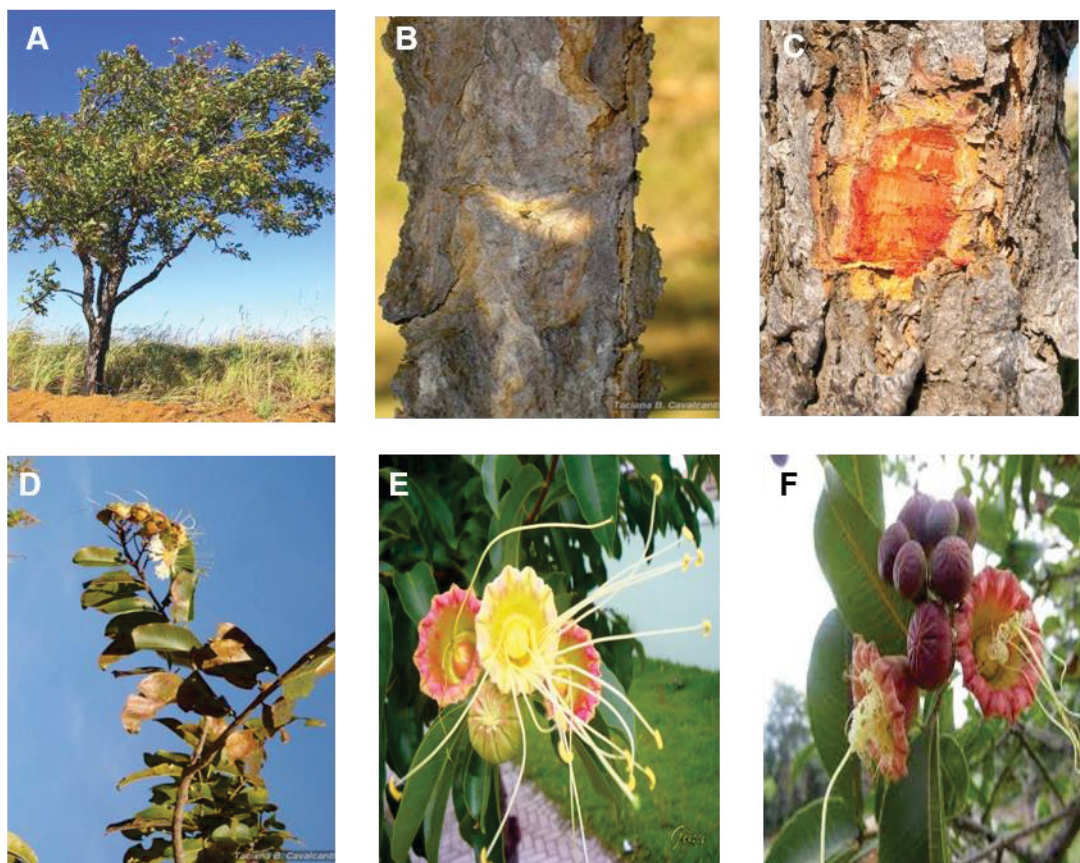


Figura 3. Aspectos botânicos de *Lafoensia pacari* A. St.- Hil. **(A)** Aspecto geral; **(B-C)** Casca do caule; **(D)** Folhas. Flores e frutos; **(E)** Flores; **(F)** Flores e fruto.
 FONTE: (A,C,E,F) ÁRVORES DO BIOMA CERRADO (2019); (B,D) FLORA DO BRASIL (2018).

A espécie *Lafoensia pacari* foi e atualmente está sendo estudada com relação a sua constituição química, atividades farmacológicas e uso popular (Tabela 1), porém muito pouco se conhece a respeito do potencial farmacológico desses compostos no câncer de mama. Em geral, os autores atribuem os efeitos biológicos da planta a presença de ácido elágico. Reichert e colaboradores (2018) elucidaram a composição química do extrato metanólico das cascas de *L. pacari* e relacionaram com o efeito citotóxico sobre uma linhagem tumoral de câncer colorretal (HRT-18), atribuindo a atividade principalmente a substâncias pertencentes à classe dos elagitaninos.

Tabela 1. Panorama químico e farmacológico dos extratos de *Lafoensia pacari* (continua)

Parte usada	Solvente extrator	Classes químicas	Substâncias	Atividade farmacológica	Referências
Folhas	-	Flavonoides	3-O-glucosídeos de canferol (I) Quercetina (II)	-	Santos; Salatino; Salatino (2000)
Folhas	Água Água/cetona	Polifenol	Ácido elágico (III)	-	Sampaio et al. (2011)
-	Água	-	-	Antidiarreico*	Coelho et al. (2005)
-	-	-	-	Cicatrizante*	Souza; Felfili (2006)
Folhas	Hidroalcoólico	Polifenol Taninos Flavonoides	Ácido elágico Punicaglina (IV) Punicalina (V) Canferol (VI) Quercetina 3-O-xilopiranosídeo (VII) Quercetina-3-O-rarnnopiranosídeo (VIII)	Tratamento de feridas cutâneas (efeito antioxidante e antiinflamatório)	Pereira et al. (2018)
Cascas	Metanol	Esteróides Polifenol Taninos Saponinas	Ácido elágico Ácido gálico (IX)	Antioxidante (<i>in vitro</i>)	Solon et al., 2000
Cascas	Água	-	-	Anti-úlceras e anti-inflamatório*	Jesus (2007)
Casca, raiz e folha	Água	-	-	Tratamento de câncer, gastrite, úlcera, cicatrizante, para o fígado, antiinflamatório e emagrecimento*	Pasa; Cabral (2009)
Cascas	Metanol	Polifenol	Ácido elágico	Efeito preventivo e curativo sobre úlceras gástricas <i>in vivo</i>	Tamashiro filho et al. (1999); Tamashiro filho et al. (2012)
Cascas	Etanol	Polifenol	Ácido elágico	Atividade analgésica, anti-edematosa e anti-inflamatória	Rogério et al. (2003); Rogério et al., (2006)
Folhas	Etanol	-	-	Atividade analgésica e antiinflamatória	Guimarães et al. (2010)
Cascas	Etanol	Saponinas Flavonoides Taninos Triterpeno	Ácido elágico	Analgésica	Nascimento et al. (2011)
Cascas	Água	-	-	Ações anti-inflamatória analgésica e depressora central <i>in vivo</i> .	Matos (2008)

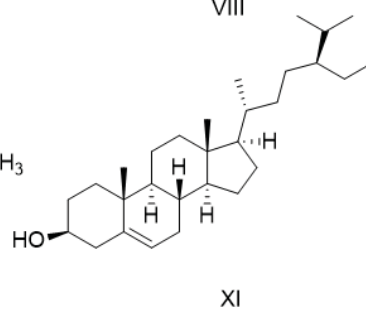
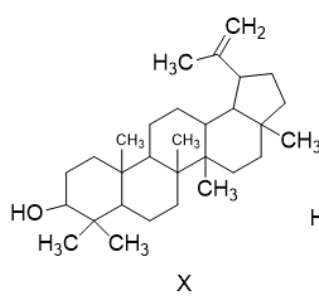
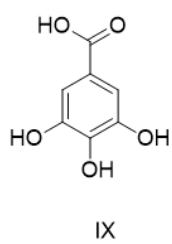
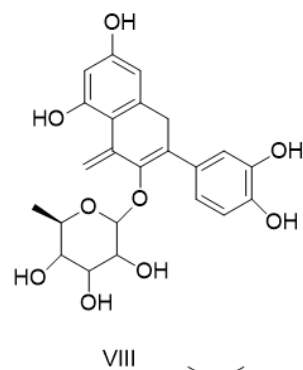
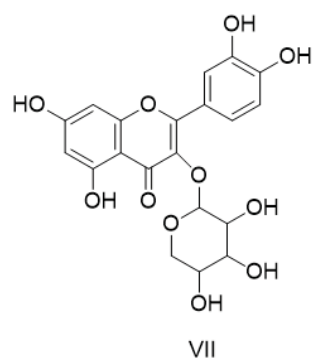
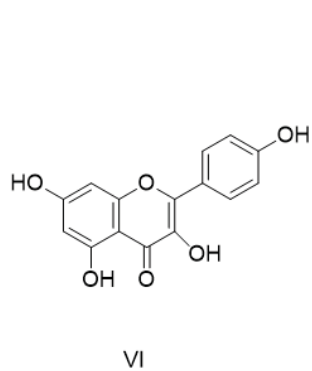
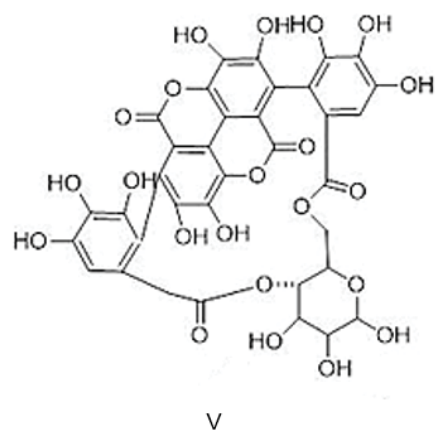
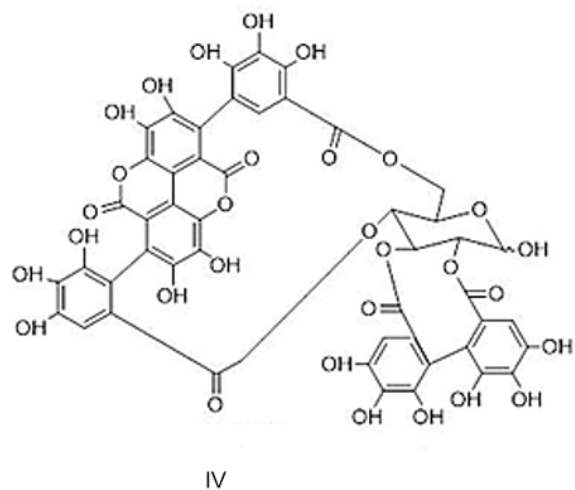
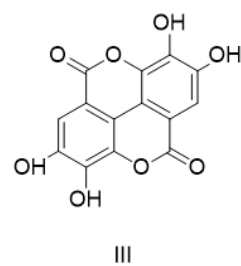
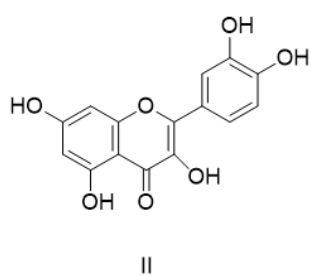
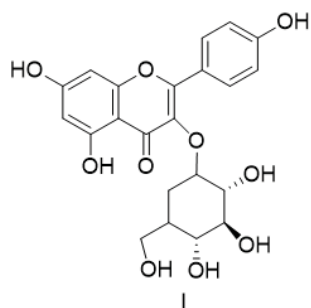
Tabela 1. Panorama químico e farmacológico dos extratos de *Lafoensia pacari* (continua)

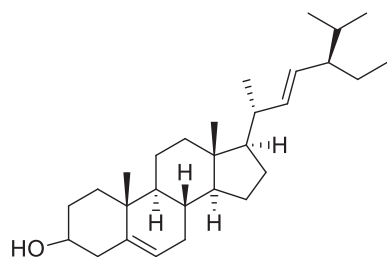
Parte usada	Solvente extrator	Classes químicas	Substâncias	Atividade farmacológica	Referências
Folhas	-	Taninos hidrolisáveis	Punicalagina	Efeito quimiopreventivo e angiogênico <i>in vivo</i>	Cameiro et al. (2016)
Cascas	Etanol	Saponinas Taninos Esteroides Triterpenos Flavonoides	Lupeol (X) β-sitosterol (XI) estigmasterol (XII)	Efeito ansiolítico e antidepressivo <i>in vivo</i>	Galdino et al. (2009); Galdino et al. (2010); Galdino et al. (2015)
Casca	-	-	-	Tratamento do câncer*	Melo et al. (2011)
Cascas	Metanol	Taninos	Ácido elágico e demais componentes não identificados do extrato	Redução da viabilidade de linhagens celulares leucêmicas (Daudi, Jurkat e U-937); Parada do ciclo celular na fase G0/G1 e indução da apoptose em células U-937. Indução da apoptose nas linhagens HRT-18, Hela e SH-SY5Y.	Marcondes et al. (2014)
Cascas	Metanol	Polifenol Saponinas Triterpenos Taninos	Ácido elágico Ácido C-hexosil elágico Ácido O-deoxihexosil elágico (XII) Ácido O-deoxihexosil O-metil elágico (XIV) Ácido O-galoi-deoxihexosil elágico Ácido O-hexosil elágico (XV) Ácido O-pentosil elágico (XVI) Catequina (XVII) Isômero de pedunculagina (XVIII) Dilactona de ácido galágico (XIX) Isômero de punicalina Galocatequina (XX) Isômero de punicalagina HHDP-O-hexosídeo (XXI) O-galoi ácido elágico (XXII)	Efeito citotóxico em linhagem celular de carcinoma colorretal (HRT-18)	Reichert et al. (2018)

Tabela 1. Panorama químico e farmacológico dos extratos de *Lafoensia pacari* (conclusão)

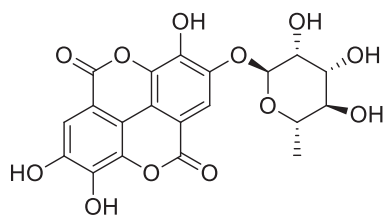
Parte usada	Solvente extrator	Classes químicas	Substâncias	Atividade farmacológica	Referências
Folhas	Metanol	-	-	Antiviral	Mueller et al. (2007)
Casca e folhas	Água/metanol	-	-	Atividade antimicrobiana	Porfírio et al. (2009)
Cascas	Metanol	-	-	Diminuição da sintomatologia de pacientes infectados por <i>H. pylori</i>	Mota Menezes et al. (2006)
Cascas e folhas	Etanol	Fenólicos Taninos Flavonoides Antraquinonas Saponinas	-	Inibição do crescimento de cepas resistentes de <i>S. aureus</i>	Lima et al. (2006)
Folhas	Etanol	Fenólicos Flavonoides Triterpenos Alcaloides Saponinas Esteroides Terpenóides Taninos	-	Inibição do crescimento bacteriano sobre <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	Firmino et al. (2016)
Cascas	Hexano, diclorometano, acetato de etila (fracionado com metanol e acetona) e etanol	Polifenólicos	Ácido elágico	Antifúngica	Silva Júnior et al. (2010)

LEGENDA: *Uso popular.
FONTE: O Autor, 2019.

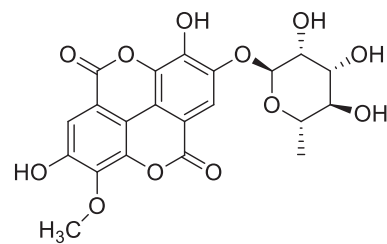




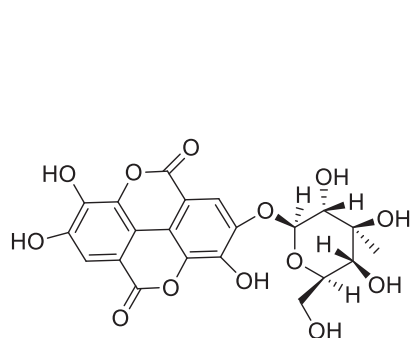
XII



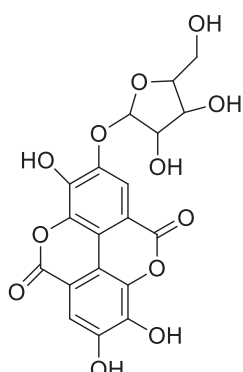
XIII



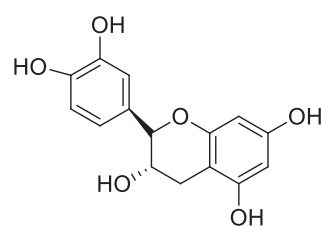
XIV



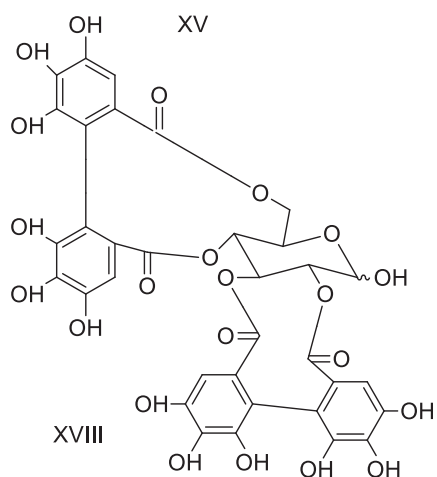
XV



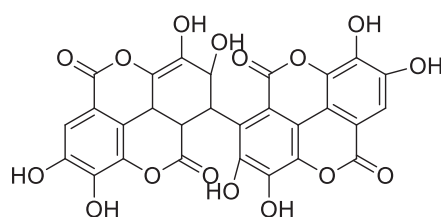
XVI



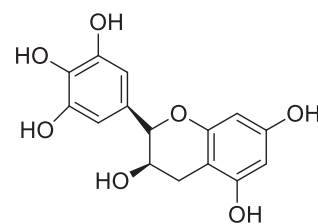
XVII



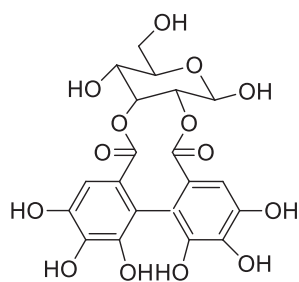
XVIII



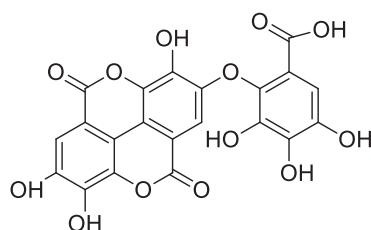
XIX



XX



XXI



XXII

Dentre os metabólitos secundários presentes nas folhas de *L. pacari* pode-se citar compostos polifenólicos, flavonoides e taninos como ácido elágico e punicalagina (SAMPAIO et al., 2011; CARNEIRO et al., 2016). No extrato das cascas de *L. pacari* são encontrados taninos, esteroides e saponinas (SOLON et al., 2000). Reichert e colaboradores (2018) caracterizaram quimicamente o extrato metanólico das cascas de *L. pacari*, identificando evidenciando a presença de carboidratos, taninos hidrolisáveis, derivados do ácido elágico, saponinas e triterpenos.

Além do interesse farmacológico, a espécie *L. pacari* é de interesse comercial utilizada para diversas finalidades. Devido às características da madeira, é usada em construção civil, obras externas e internas, marcenaria, tacos para assoalhos, taboados, cabo de ferramentas e mourões (CARVALHO, 1994). No artesanato, é utilizada pelos índios guaranis para a fabricação de flechas (FIRMO et al., 2016). Atualmente seu principal uso é na arborização de ruas e paisagismo de parques e praças, devido a rusticidade e beleza de suas flores. Além disso, seu cultivo também é recomendado na recuperação de áreas degradadas, auxiliando na reposição de mata ciliar (GALVÃO, 2017).

3.6 ÁCIDO ELÁGICO, ELAGITANINOS E CÂNCER DE MAMA

Apesar do extrato metanólico das cascas de *L. pacari* ter sido testado sobre diversas linhagens celulares tumorais por Marcondes e colaboradores (2014), não existem relatos na literatura a respeito da ação do extrato sobre células de câncer de mama. Entretanto, existem estudos que relatam o efeito de alguns taninos presentes no extrato como punicalagina e ácido elágico, isolados ou presentes em extratos de outras espécies vegetais sobre células de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7).

A punicalagina é um tanino hidrolisável que forma ácido elágico como produto de sua hidrólise, e é o elagitanino predominante na romã (*Punica granatum L.*) (LARROSA; TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2006; AQIL et al., 2012; CARNEIRO et al., 2016). Aqil e colaboradores (2012) demonstram que a punicalagina extraída das cascas da romã exerce efeito concentração dependente sobre a viabilidade das células de câncer de mama da linhagem MCF-7. Os autores acreditam que este efeito é devido à formação de ácido elágico resultante da hidrólise deste elagitanino.

Chen et al. (2015) relataram o efeito concentração-dependente do ácido elágico sobre a proliferação de células da linhagem MCF-7 e sobre o ciclo celular, resultando em parada do ciclo na fase G1 e G2. Os autores também relataram o aumento das células apoptóticas. O mesmo efeito foi observado quando extratos de plantas que possuem o ácido elágico como composto majoritário foram testados sobre linhagens celulares tumorais de mama. O extrato metanólico das cascas de romã (*Punica granatum L.*) demonstrou efeito antiproliferativo e apoptótico sobre células MCF-7 (DIKMEN; OZTURK, N.; OZTURK, Y, 2011), bem como o extrato de *Sanguisorba officinalis* inibiu seletivamente a proliferação das células tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7 de maneira concentração-dependente com indução de apoptose (WANG et al., 2012).

Estudo relatam ainda que o ácido elágico possui atividade antiestrogênica sobre células MCF-7, e que esta ação é seletiva, pois não foram observados efeitos sobre a viabilidade de células do epitélio endometrial (PAPOUTSI et al., 2005). Além disso, o ácido elágico pode atuar modulando a malignidade induzida pelo estradiol, regulando negativamente a expressão do gene telomerase transcriptase reversa (hTERT), um gene importante na tumorigênese de células que expressam receptores de hormônio (STRATI et al., 2009).

Os resultados encontrados na literatura com relação à ação destas substâncias sobre células de câncer de mama, somado ao estudo químico realizado por Reichert e colaboradores (2018), indicam que a *Lafoensia pacari* pode exercer atividade promissora sobre células tumorais de mama.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Os extratos de *Lafoensia pacari* foram produzidos e cedidos para esse estudo pela Dra. Cristiane Loiva Reichert e pelo Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos do laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Paraná em abril de 2017.

A coleta e o processamento do material vegetal foram realizados conforme descrito por Reichert e colaboradores (2018). Para a produção dos extratos, 10 g de pó das cascas de *L. pacari* foram maceradas por 24 h em contato com 100 mL do líquido extrator. Cada extrato foi produzido com um líquido extrator diferente (água, metanol, acetona ou etanol) ou com a mistura destes solventes. A proporção dos solventes foi determinada pelo método Simplex Centroid Design, com auxílio do software Design-Expert 7.0.0 resultando em 19 extratos (Tabela 2). Em seguida, todos os extratos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida a 60 °C, liofilizados e conservados a temperatura de 4-8 °C até o momento do uso.

Tabela 2. Relação de extratos obtidos com diferentes líquidos extratores pelo método Simplex Centroid Design.

Extratos	Líquido extrator	Proporção (% v/v)	Rendimento (% p/p)
Simplex Centroid Design	E-1	água	100
	E-2	metanol : etanol	50 : 50
	E-3	metanol : acetona : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33
	E-4	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 62,5 : 12,5 : 12,5
	E-5	metanol	100
	E-6	água : metanol	50 : 50
	E-7	água : acetona	50 : 50
	E-8	água : metanol : acetona : etanol	62,5 : 12,5 : 12,5 : 12,5
	E-9	água : etanol	50 : 50
	E-10	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 12,5 : 62,5 : 12,5
	E-11	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 12,5 : 12,5 : 62,5
	E-12	etanol	100
	E-13	água : acetona : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33
	E-14	água : metanol : acetona : etanol	25 : 25 : 25 : 25
	E-15	acetona : etanol	50 : 50
	E-16	acetona	100
	E-17	água : metanol : acetona	33,33 : 33,33 : 33,33
	E-18	água : metanol : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33
	E-19	metanol : acetona	50 : 50

FONTE: Reichert et al. (2017) - Dados não publicados.

Para as análises cromatográficas os extratos secos foram diluídos em metanol, e para os ensaios biológicos *in vitro*, foi preparada uma solução estoque em DMSO na concentração de 40 mg/mL de cada extrato.

4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS

As análises cromatográficas e ensaios de captação celular foram realizados em um cromatógrafo líquido Agilent 1100 acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) constituído por uma bomba quaternária G1311A, degaseificador G1379A, injetor automático G1329A, detector de arranjo fotoelétrico G1315B e uma estação de trabalho LC equipada com o software de análise química A.10.02 para coleta e aquisição de dados.

Os ensaios de espectrometria de massas foram realizados em um cromatógrafo líquido Agilent 1200 (Wilmington, EUA) composto de uma bomba binária G1312B, degaseificador G1379B e forno de coluna G1316B conectado a um Gerente de Amostra CTC (Modelo 2777), Waters Corporation, Milford, EUA) e acoplado a um espectrômetro de massa do tipo Triplo Quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems, Toronto, Canadá) e fonte de ionização por eletrospray (ESI).

A cromatografia foi realizada em coluna pré-coluna XBridge C18 (4,6 mm x 20 mm, 5 µm) e na coluna XBridge C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm - Waters Corporation, Mildford, EUA), com volume de injeção de 50 µL taxa de 1 mL/min, monitorada a 270 nm e temperatura da coluna mantida a 25 °C. A fase móvel consistiu de uma mistura de água Milli-Q acidificada com ácido fosfórico (0,1%, v / v) (A) e metanol (B) em sistema de gradiente exploratório (5 a 95% B em 60 min e 95% B por 10 min). Os extratos foram diluídos em metanol na concentração final de 1 mg/mL e filtrados em filtros de membrana de PTFE de 0,45 µm (Millex TM, Millipore). Para as análises de espectrometria de massas, foram utilizadas as mesmas condições de CLAE-DAD, substituindo apenas o ácido na fase móvel (ácido fórmico 0,1%, pH 2,6).

A identificação das substâncias foi feita por comparação com a literatura ou confirmada com uso de padrão. O padrão de ácido elágico utilizado foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os solventes utilizados foram grau HPLC e adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany).

4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

4.3.1 Cultivo de células

As células das linhagens tumorais MCF-7 (carcinoma humano de mama – código 0162) e MDA-MB-231 (carcinoma mamário humano – código 0392) foram adquiridas comercialmente no banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ - UFRJ). Já a linhagem não tumoral McCoy (fibroblasto murino) foi obtida comercialmente no Instituto Adolfo Lutz.

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e solução de antibióticos contendo penicilina e estreptomicina (10.000 U/mL - GIBCO, Baltimore, EUA).

As células foram mantidas em uma densidade de 1×10^5 células/mL de meio, à temperatura de 37 °C e em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.3.2 Avaliação do potencial citotóxico e antiproliferativo seletivo dos extratos de *L. pacari*

4.3.2.1 Ensaio da viabilidade celular pelo método da redução do sal de tetrazólio (MTT)

A viabilidade metabólica das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e McCoy foi avaliada pelo ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo) de acordo com Mosmann (1983).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, nas concentrações demonstradas na Tabela 3, utilizando meio de cultivo suplementado com 5% de SFB, seguido de incubação em estufa (37 °C e atmosfera de 5% de CO₂) por 24 horas para

adesão das mesmas. Foi realizada a remoção do meio de cultivo e, em seguida, as células foram tratadas com concentrações variadas dos extratos diluídos em meio de cultivo por 72 h (5 – 50 µg/mL). Como controle negativo foi utilizado o veículo das diluições dos extratos (DMSO 0,125%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA,) e meio de cultivo. Duas horas antes do término do tratamento, a cada poço foi adicionado 20 µL da solução de MTT (5 mg/mL). As placas foram incubadas novamente por mais 2 horas. Completado o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado com auxílio de uma micropipeta e os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 100 µL de DMSO (PA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a cada poço. Após homogeneização em shaker por 10 minutos, os resultados foram lidos em leitor de microplaca (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) a 570 nm.

Tabela 3. Concentração da suspensão de células utilizada no plaqueamento dos ensaios de avaliação do efeito citotóxico e antiproliferativo dos extratos de *L. pacari*.

Linhagem celular	Concentração da suspensão de células/cm²
MCF-7	16,0 x 10 ³
MDA-MB-231	9,6 x 10 ³
McCoy	6,4 x 10 ³

FONTE: O autor (2019).

Para cada placa com células, outra equivalente sem células foi manipulada nas mesmas condições citadas anteriormente, para ser utilizada como branco.

A redução do sal MTT do grupo controle (CTRL) foi considerada como 100% de viabilidade metabólica. Os valores de concentração inibitória média (CI₅₀) foram determinados a partir do software GraphPad Prisma 6 (San Diego, EUA). Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes a fim de garantir a consistência dos resultados.

A determinação da porcentagem de células viáveis foi calculada através da seguinte fórmula (EBADA et al., 2008):

$$\% \text{ células viáveis} = 100 \times \frac{\text{Abs células tratadas} - \text{Abs branco tratado}}{\text{Abs células CTRL} - \text{Abs branco CTRL}}$$

4.3.2.2 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) foi calculado conforme adaptação feita por Badisa et al. (2009), considerando a concentração inibitória média (CI₅₀) calculada

previamente pelos ensaios de MTT para células normais e tumorais, conforme a equação:

$$IS = \frac{CI50 \text{ do extrato na célula não - tumoral}}{CI50 \text{ do extrato na célula tumoral}}$$

Uma vez que o índice de seletividade demonstra a atividade diferencial de um determinado agente, quanto maior o índice fornecido pela equação, mais seletivo é o efeito do agente testado sobre as células tumorais (KOCH et al, 2005).

4.3.2.3 Ensaio de simples contagem

Células MDA-MB-231 e MCF-7 foram plaqueadas em 6 poços, dispostos em 3 pares (controle/tratamento), em uma placa de 24 poços, utilizando meio de cultivo suplementado com 5% de SFB. O primeiro par foi incubado com uma suspensão celular em densidade proporcional a utilizada para os ensaios anteriores de MTT (Tabela 3). O segundo e terceiro pares, foram incubados com a metade e um quarto da densidade celular do primeiro par, respectivamente. Após 24 h de incubação, as células foram tratadas com a CI_{50} dos respectivos extratos, diluído em meio de cultivo. O controle negativo foi tratado com o diluente dos extratos (DMSO 0,04%). Após 72 h, o tratamento foi retirado de todos os poços e as células do primeiro par controle/tratado foram contadas em câmara de Neubauer conforme representado na Figura 4. Os demais poços foram lavados com PBS (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e adicionado meio de cultura (RPMI 1640 - GIBCO, Baltimore, EUA) suplementado com 10% de SFB (sem tratamento). Após 2 e 4 dias da retirada do tratamento, as células do segundo e terceiro pares experimentais foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer (McGAHON et al., 1995).

O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

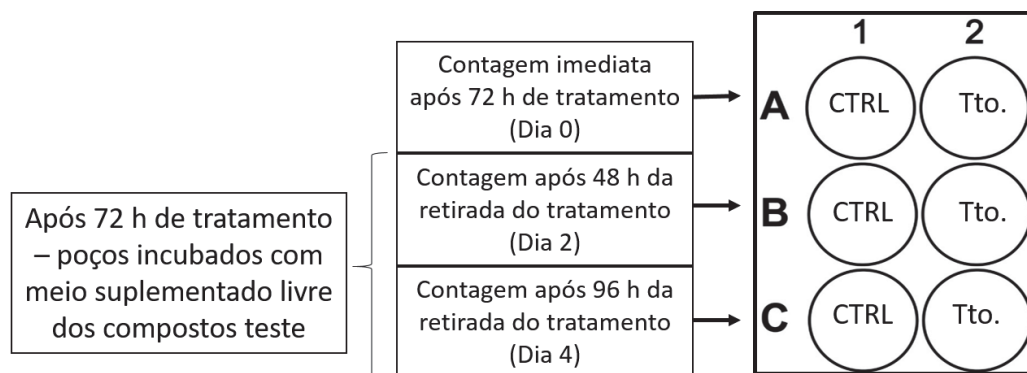


Figura 4. Esquema de contagem das células após 72 horas de tratamento. CTRL: Células incubadas com meio de cultura sem tratamento. Tto: Células incubadas com o extrato de *L. pacari*.
FONTE: Adaptado de SANTOS (2018).

4.3.2.4 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico)

As células tumorais e não-tumorais utilizadas neste estudo foram plaqueadas em placas de 24 poços em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) suplementado com 5% de SFB (500 células/poço para MCF-7, 300 células/poço para MDA-MB-231 e 200 células/poço para McCoy), seguido de 24 horas de incubação em estufa (37 °C e atmosfera de 5% de CO₂). Após esse período, as células foram tratadas com concentrações variadas dos extratos mais promissores (2 – 32 µg/mL) selecionados com base no índice de seletividade, diluídas em meio de cultivo. Como controle negativo foi utilizado veículo utilizado para diluição dos extratos (DMSO 0,08%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Ao fim das 72 horas, o meio de cultivo foi retirado e os poços lavados com PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por três vezes. As células foram incubadas com meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) suplementado com 10% de SFB até verificação da formação de colônias, ou seja, presença de um ou mais grupos celulares com aproximadamente 50 células. O tempo de incubação variou de acordo com o tempo de dobramento característico de cada linhagem celular devendo este ser equivalente a pelo menos seis ciclos de divisão celular (FRANKEN et al., 2006).

Após visualização das colônias, estas foram fixadas com metanol 70% e coradas com uma solução de cristal violeta 0,2% para posterior quantificação (FRANKEN et al., 2006). Este ensaio foi realizado em triplicata. As imagens foram analisadas pelo software Schiefer Counter desenvolvido e descrito por Santos (2018). Os resultados foram expressos em número de colônias e pela área ocupada pelas colônias em um poço com superfície para crescimento das células.

A média da área ocupada pelas colônias no poço do grupo controle foi considerada como 100%. Os valores de concentração inibitória média (CI₅₀) foram determinados utilizando o software GraphPad Prisma 6 (San Diego, EUA).

4.3.3 Ensaio da captação do extrato

A captação celular do extrato E-2 pelas linhagens MDA-MB-231 e McCoy foi avaliada por meio da adaptação do protocolo de Larrosa e colaboradores (2006).

Células das linhagens MDA-MB-231 foram cultivadas em garrafas de cultivo T75 até atingirem 80% de confluência (aproximadamente 4 milhões de células) e foram incubadas durante 2, 6 e 24 horas com meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) contendo 100 µg/mL do extrato E-2. Após o período de tratamento, o meio de cultura foi removido, acidificado com 1,5% de ácido fórmico e filtrado através do cartucho de extração de fase sólida OASIS[®] HLB (Waters), o qual retém compostos fenólicos. O cartucho foi previamente ativado com 1 mL de metanol e 1 mL de água. Cada 1 mL de meio foi eluído com 300 µL de metanol. A fração metanólica foi coletada e concentrada em Centrivap (Labconco, Kansas City, EUA) à 40 °C sob pressão reduzida, ressuspensa em metanol no dia da análise, centrifugada a 11357 *g* por 20 minutos e o sobrenadante foi analisado por CLAE-DAD. As células tratadas foram lavadas com PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), desaderidas com auxílio de um *scraper* e 2 mL de metanol e lisadas mecanicamente por sonicação em banho de gelo durante 18 minutos, centrifugadas a 11357 *g* por 15 minutos, e o sobrenadante foi concentrado sob pressão reduzida. No dia da análise, a fração metanólica do extrato celular foi ressuspensa em metanol e analisada por CLAE-DAD.

Em outros experimentos, o extrato E- 2 (100 µg/mL) foi incubado apenas com o meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) por 2 horas e os compostos foram analisados pelo mesmo método realizado na presença celular. Como controle foi utilizado células incubadas com DMSO 0,25%, correspondente à porcentagem de DMSO presente no tratamento.

Os ensaios para a linhagem não-tumoral (McCoy) foram realizados conforme descrito anteriormente, respeitando a densidade celular utilizada para as células tumorais (aproximadamente 4 milhões de células) nos tempos de 2 e 6 horas.

A análise por CLAE-DAD foi realizada conforme descrito no item 4.2, onde foram injetados 50 µL de amostra no cromatógrafo (Agilent Technologies, 1100 series).

4.4 ESTUDO DE CORRELAÇÃO

Estudos de quimiometria foram feitos utilizando Correlação de Pearson a fim de verificar a semelhança na composição química dos 19 extratos de *L. pacari*, baseado na área dos picos das substâncias extraídas por cada combinação de solventes. A correlação de Pearson também foi utilizada para correlacionar a composição dos extratos utilizando a área dos picos dos cromatogramas obtidos, e identificar as principais substâncias relacionadas com a atividade citotóxica e que contribuem para o efeito seletivo, utilizando os dados de CI_{50} dos extratos para as diferentes linhagens celulares utilizadas neste estudo. Para a inclusão dos dados da atividade biológica na matriz de dados, os resultados de CI_{50} obtidos nos ensaios de citotoxicidade foram incluídos utilizando $-CI_{50}$, a fim de transformar em valor de citotoxicidade, sendo este diretamente proporcional à área do pico.

A correlação mensura a direção e o grau da relação linear entre duas variáveis quantitativas, em outras palavras, o coeficiente de correlação de Pearson (r) é uma medida de associação linear entre variáveis. O modelo linear supõe que o aumento ou decréscimo de uma unidade na variável X gera o mesmo impacto em Y (FIGUEIREDO FILHO; SILVA JÚNIOR, 2009).

O coeficiente de correlação Pearson (r) varia de -1 a 1. O sinal indica direção positiva ou negativa do relacionamento e o valor sugere a força da relação entre as variáveis. Uma correlação perfeita (-1 ou 1) indica que o escore de uma variável pode ser determinado exatamente ao se saber o escore da outra. No outro oposto, uma correlação de valor zero indica que não há relação linear entre as variáveis FIGUEIREDO FILHO; SILVA JÚNIOR, 2009). Dancey e Reidy (2018) classificam $r = 0,10$ até $0,30$ (fraco), $r = 0,40$ até $0,60$ (moderado) e $r = 0,70$ até $1,00$ (forte).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP) ou erro padrão da média (EPM). Para avaliar os resultados entre os grupos foram realizados análise de variância ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos com valores de $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*) conforme aplicado. As análises foram realizadas com o uso do software GraphPad Prisma (San Diego, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

A análise por CLAE-DAD dos extratos demonstrou que apesar de terem sido obtidos a partir de diferentes combinações de líquidos extratores (Tabela 2), os 19 extratos apresentaram constituição química qualitativamente similar, variando apenas na área do pico dos componentes (mAU), conforme pode ser observado na Figura 5.

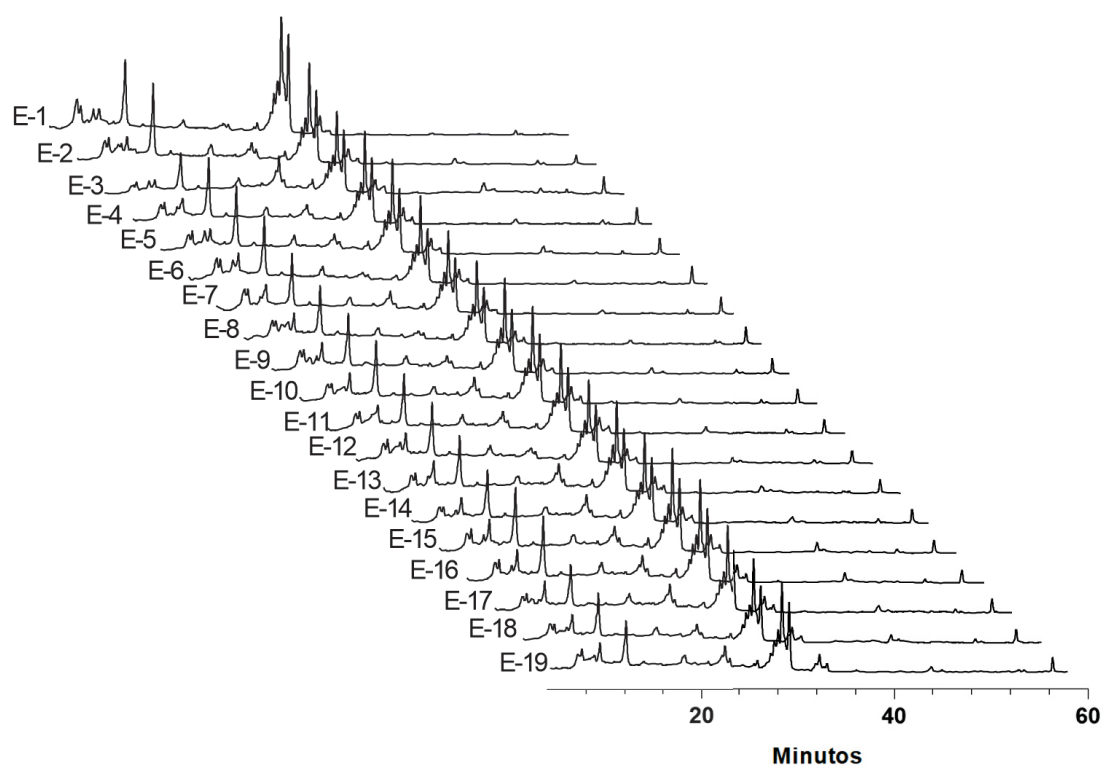


Figura 5. Perfil cromatográfico obtido por CLAE dos 19 diferentes extratos das cascas do caule de *L. pacari*, evidenciando a similaridade na composição química qualitativa.
FONTE: O Autor (2019).

Análise de CLAE-MS dos extratos revelou a presença de uma mistura complexa onde foram caracterizados 20 componentes nas amostras de *L. pacari* dos 24 picos selecionados, incluindo taninos hidrolisáveis, ácido elágico e derivados, saponinas e triterpenos (Figura 6 e Tabela 4).

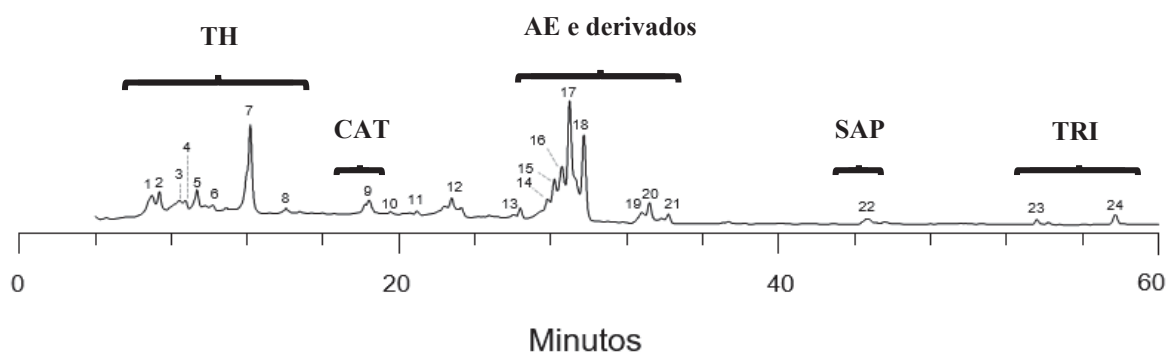


Figura 6. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD dos principais picos do extrato E-2 incluindo os taninos hidrolisáveis (TH), catequinas (CAT), ácido elágico (AE) e derivados, saponinas (SAP) e triterpenos (TRI).

FONTE: O Autor (2019).

Tabela 4. Compostos detectados no extrato E-2 por CLAE-MS modo negativo.

Pico	Substância	t _R (min)	MS [M-H]	Referência
1	HHDP-O-hexosídeo	7,01	481	
2	Isômero de punicalina	7,39	781	
3	Isômero de pedunculagina	8,45	783	
4	O-galoil punicalina	8,76	933	
5	Elagitanino	9,37	685	
6	Elagitanino	10,91	685	
7	Isômero de punicalagina	12,18	1083	
8	Isômero de punicalagina	14,07	1083	
9	Catequina	18,43	289	Fischer et al. (2011)
10	NI	20,95	-	Mena et al. (2012)
11	NI	22,70	-	Calani et al. (2013)
12	NI	23,28	-	Ambigaipalan et al. (2016)
13	NI	26,39	-	
14	Isômero de ácido hexosil elágico	27,85	463	Abdulla et al. (2017)
15	Isômero de ácido hexosil elágico	28,19	463	
16	Ácido O-pentosil elágico	28,59	433	Reichert et al. (2018)
17	Ácido O-deoxihexosil elágico	28,99	447	
18	Ácido elágico*	29,75	301	
19	Ácido O-deoxihexosil O-metil elágico	32,78	461	
20	Ácido O-deoxihexosil O-metil elágico	33,21	461	
21	Ácido O-galoil-deoxihexosil elágico	34,19	599	
22	Saponina	44,71	841	
23	Triterpeno	53,61	501	
24	Triterpeno	57,73	487	

LEGENDA: NI: Não identificada; *Identificado com auxílio de padrão. FONTE: O Autor (2019).

Os principais compostos foram detectados como íons desprotonados $[M-H]^-$ e revelou a presença de HHDP-O-hexosídeo (m/z 481), isômero de punicalina (m/z 781), isômero de pedunculagina (m/z 783), O-galoil-punicalina (m/z 933), elagitanino (m/z 685), isômero de punicalagina (m/z 1083), nos menores tempos de retenção (7,01 a 14,07 min) e em seguida catequina (m/z 289). Também foram identificados o ácido elágico e seus derivados glicosilados: ácido O-hexosil-elágico (m/z 463), Isômero de ácido hexosil elágico (m/z 463), ácido O-pentosil elágico (m/z 433), Ácido O-deoxihexosil elágico (m/z 447), ácido elágico (m/z 301), ácido O-deoxi-hexosil O-metil-elágico (m/z 461), ácido O-galoil-deoxihexosil elágico (m/z 599), saponina (m/z 841) e triterpeno (m/z 487 e 501). Alguns desses compostos não foram identificados (picos 10-13). Os resultados demonstrados na Figura 6 e Tabela 4 evidenciam que a composição química dos extratos foi em parte semelhante a do extrato metanólico elucidado por Reichert e colaboradores (2018).

Embora os extratos fossem qualitativamente semelhantes, a análise por CLAE-DAD mostrou algumas diferenças na concentração de cada composto, principalmente dependendo do processo de extração ao qual a amostra foi submetida. Nos 19 extratos obtidos, a área dos picos (mAU) foram substancialmente diferentes, com destaque especial para os picos 3, 6 e 22.

5.1.1 Análise de correlação entre os dados de CLAE-DAD da composição química dos 19 extratos de *L. pacari*

A matriz de correlação apresentada na Figura 7 evidenciou a semelhança na composição dos extratos de *L. pacari* obtidos com diferentes misturas de solventes, demonstrando que os extratos são altamente correlacionados. Os menores fatores de correlação são 0,91 entre os extratos E-3 e E-6, e entre os extratos E-3 e E-16. E-1, E-3 e E-16 foram os extratos que apresentaram menor correlação comparado com os demais. Há que se considerar que os coeficientes de correlação encontrados nesta análise são todos maiores que 0,91 representando fortes correlações (DANCEY; REIDY, 2018). A maioria dos extratos se mostrou altamente correlacionado, apresentado valores de “r” igual a 0,99. Os resultados apresentados corroboram com o perfil cromatográfico semelhante dos extratos apresentados na Figura 5.

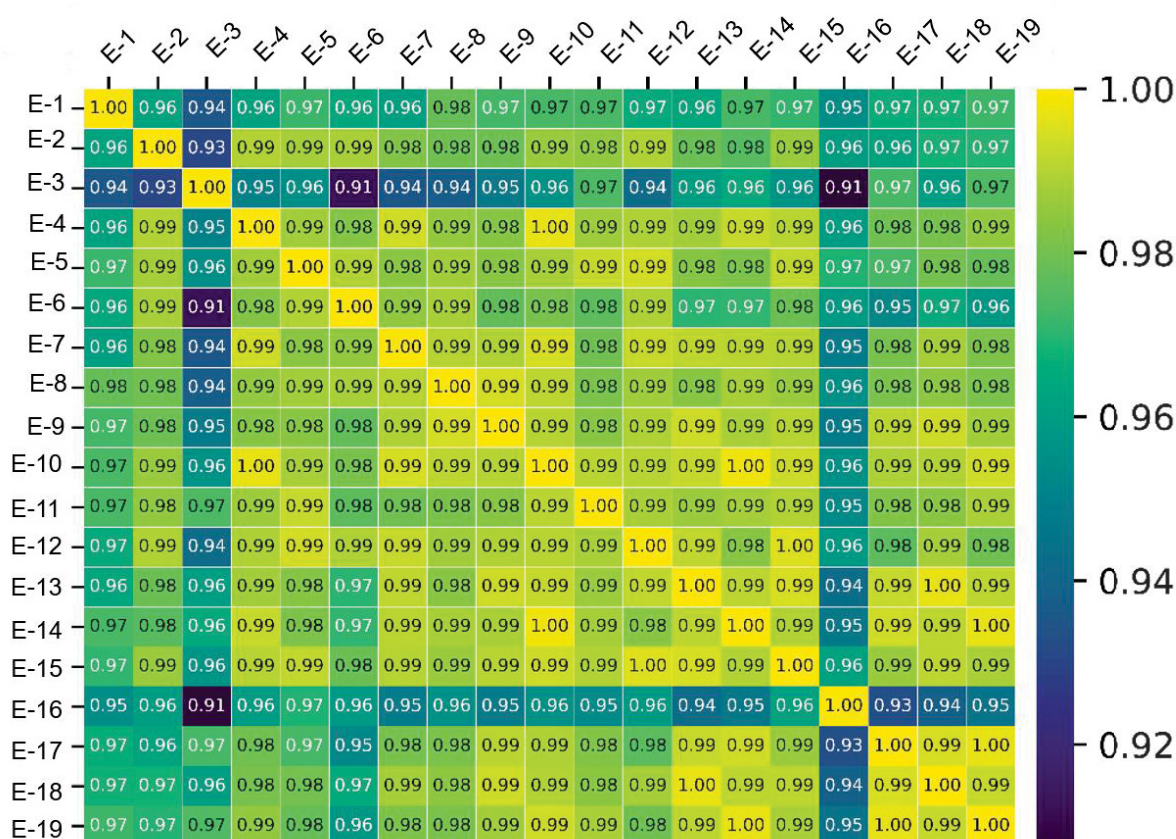


Figura 7. Matriz de correlação de Pearson entre a composição química dos 19 extratos de *L. pacari* evidenciando os fatores de correlação (r) elevados. A escala de cores expressa a variação do fator de correlação, variando do amarelo (mais correlacionado) para azul escuro (menos correlacionado).
FONTE: O Autor (2019).

5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

5.2.1 Avaliação do potencial citotóxico e/ou antiproliferativo dos extratos de *L. pacari* pelo ensaio da redução do sal MTT

O ensaio da redução do sal MTT avalia indiretamente a viabilidade celular medindo a capacidade metabólica das células. Este ensaio é comumente utilizado para triar um grande número de potenciais drogas anticâncer a partir da determinação do número de células que permanecem viáveis após um período de incubação definido (BOYD, 1997; RISS et al., 2011).

O efeito dos 19 extratos de *L. pacari* sobre a viabilidade celular foi avaliado sobre as duas linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e sobre a linhagem não tumoral (McCoy). A concentração inibitória média (CI_{50}) e o índice de seletividade foram calculados e os dados estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) determinados para os diferentes extratos de *L. pacari* em linhagens McCoy, MDA-MB-231 e MCF-7 por 72 horas e seus respectivos índices de seletividade (IS).

Extratos	Líquido extrator	Proporção (% v/v)	McCoy	MDA-MB-231		MCF-7	
			Cl_{50}	Cl_{50}	IS	Cl_{50}	IS
E-1	Água	100	29,07 \pm 2,42	19,37 \pm 1,77	1,5	39,49 \pm 1,10	0,7
E-2	metanol : etanol	50 : 50	30,85 \pm 1,46	16,82 \pm 0,87	1,8	24,00 \pm 1,63	1,3
E-3	metanol : acetona : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33	26,95 \pm 0,94	15,21 \pm 1,90	1,8	25,13 \pm 1,80	1,1
E-4	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 62,5 : 12,5 : 12,5	32,13 \pm 2,41	16,23 \pm 0,60	2,0	26,23 \pm 0,74	1,2
E-5	Metanol	100	27,73 \pm 1,80	29,37 \pm 0,35	0,9	25,31 \pm 2,11	1,1
E-6	água : metanol	50 : 50	28,37 \pm 1,66	28,73 \pm 0,76	1,0	25,74 \pm 2,20	1,1
E-7	água : acetona	50 : 50	26,81 \pm 2,83	19,11 \pm 0,75	1,4	27,85 \pm 1,30	1,0
E-8	água : metanol : acetona : etanol	62,5 : 12,5 : 12,5 : 12,5	26,25 \pm 2,15	18,03 \pm 1,57	1,5	29,39 \pm 0,49	0,9
E-9	água : etanol	50 : 50	30,86 \pm 2,96	21,52 \pm 2,75	1,4	34,01 \pm 2,47	0,9
E-10	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 12,5 : 62,5 : 12,5	24,35 \pm 2,97	20,26 \pm 0,91	1,2	28,89 \pm 2,72	0,8
E-11	água : metanol : acetona : etanol	12,5 : 12,5 : 12,5 : 62,5	23,48 \pm 1,83	21,12 \pm 2,67	1,1	19,79 \pm 1,85	1,2
E-12	Etanol	100	23,36 \pm 1,55	21,29 \pm 1,44	1,1	21,78 \pm 1,45	1,1
E-13	água : acetona : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33	25,72 \pm 0,92	27,57 \pm 1,19	0,9	35,97 \pm 2,38	0,7
E-14	água : metanol : acetona : etanol	25 : 25 : 25 : 25	27,32 \pm 2,72	21,31 \pm 2,78	1,3	27,18 \pm 2,05	1,0
E-15	acetona : etanol	50 : 50	22,89 \pm 0,75	21,81 \pm 0,96	1,0	25,72 \pm 0,59	0,9
E-16	Acetona	100	27,08 \pm 0,94	21,30 \pm 1,35	1,3	32,60 \pm 2,79	0,8
E-17	água : metanol : acetona	33,33 : 33,33 : 33,33	23,18 \pm 2,45	19,29 \pm 2,16	1,2	37,24 \pm 2,46	0,6
E-18	água : metanol : etanol	33,33 : 33,33 : 33,33	30,21 \pm 1,81	28,30 \pm 1,47	1,1	28,61 \pm 2,37	1,1
E-19	metanol : acetona	50 : 50	20,15 \pm 0,55	23,52 \pm 1,43	0,9	33,89 \pm 2,45	0,6

FONTE: O Autor (2019).

A redução de 50% das células viáveis observada neste ensaio (Tabela 5) pode ser devida à capacidade dos extratos de induzir a morte celular ou simplesmente por estes serem capazes de diminuir a capacidade proliferativa das células. Portanto, este método não permite distinguir se os extratos exercem efeito citotóxico ou antiproliferativo (BOYD, 1997; RISS et al., 2011).

Suffiness e Pessuto (1990) consideram frações ou extratos vegetais como agentes antineoplásicos em potencial, se o valor de CI_{50} para 72 h for menor ou igual a 30 $\mu\text{g/mL}$. Observando esse critério, uma vez que os valores de CI_{50} dos extratos sobre células MDA-MB-231 variaram entre $15,21 \pm 1,90 \mu\text{g/mL}$ e $29,37 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$, todos os extratos testados podem ser considerados agentes antineoplásicos em potencial. O mesmo ocorre para a maioria dos extratos frente à linhagem MCF-7, com exceção dos extratos E-1, E-9, E-13, E-16, E-17 e E-19 que apresentaram valores de CI_{50} maiores que 30 $\mu\text{g/mL}$.

Para MDA-MB-231 os extratos E-2, E-3 e E-4 apresentaram os menores valores de CI_{50} . Além disso, estes extratos foram os mais seletivos, apresentando IS de 1,8 para E-2 e E-3, e de 2,0 para E-4. Considerando o critério seletividade, os extratos mencionados são os mais promissores, não havendo diferença significativa entre eles com relação ao efeito.

Com relação à MCF-7, os extratos E-11 ($19,79 \pm 1,85 \mu\text{g/mL}$) e E-12 ($21,78 \pm 1,45 \mu\text{g/mL}$) apresentaram os menores valores de CI_{50} . Quanto à seletividade, o extrato que apresentou maior IS foi o E-2 (1,3), seguido dos extratos E-4 e E-11 (IS= 1,2). Dos 19 extratos, onze deles não foram seletivos para MCF-7, ou seja, apresentaram valores de CI_{50} para célula não tumoral igual ou inferior àqueles encontrados para a célula tumoral, levando a um $IS \leq 1$ (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2014).

Estudos apontam que o extrato hidroalcoólico das folhas de *L. pacari* não exerce toxicidade sobre células CHO-k1 (células de tecido de ovário de hamster chinês) e L929 (fibroblasto murino). Segundo os autores, este extrato também possui ácido elágico e elagitaninos derivados da punicalagina em sua composição química, corroborando com os dados demonstrados (PEREIRA et al., 2018).

Os resultados obtidos mostram que os valores de CI_{50} determinados em células MDA-MB-231 de quase todos os extratos testados, foram inferiores aos encontrados para as células MCF-7 (exceto E-5, E-6 e E-11). Esta diferença de

sensibilidade entre as duas diferentes linhagens já foi relatada anteriormente para outros compostos, tal como a genisteína (YANG, S.; ZHOU; YANG, X., 2007). Autores sugerem que essa diferença pode ser explicada por distinções no padrão de expressão gênica entre as linhagens de mama. Estas podem ser dadas principalmente nos níveis de expressão da caspase 3 (essenciais na apoptose) a qual é relatada ser menor em células MCF-7, e pelo níveis de expressão do gene p53, o qual encontra-se mais expresso neste tipo celular, podendo ativar a maquinaria de reparo do DNA e estar relacionado com a resistência ao efeito da droga aplicada (JÄNICKE et al., 1998; YANG, S.; ZHOU; YANG, X., 2007; MIRZAPUR et al., 2018; ASHOUR et al., 2018). Ashour e colaboradores (2018) relataram que tumores ER positivos, tais como a MCF-7, resistem ao efeito do tratamento com doxorrubicina por meio da elevação da expressão do gene TP53 e consequente estimulação da maquinaria de reparo do DNA.

Com a finalidade de eleger os extratos mais promissores para dar continuidade ao estudo, em vista da grande semelhança de CI_{50} entre eles, reflexo da similaridade da composição química, o quesito da seletividade foi levado em consideração. O extrato E-2 mostrou-se o mais promissor para ambas as linhagens tumorais de mama, entretanto, como não foram observadas diferenças no IS entre os extratos E-3 e E-4 para MDA-MB-231, estes foram também selecionados para dar seguimento aos estudos nesta linhagem.

5.2.2 Ensaio de simples contagem

O ensaio de simples contagem foi realizado com as células tumorais a fim de confirmar o valor de CI_{50} (72 horas) obtido pelo método da redução do sal MTT para os extratos mais promissores no quesito seletividade e avaliar a perduração do efeito por 2 e 4 dias após a retirada do tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle, e estão demonstrados na Figura 8.

Em relação à linhagem MCF-7 (Figura 8-A) os resultados demonstraram que os valores de concentração encontrados anteriormente para a CI_{50} estão corretos, uma vez que após 72 h de tratamento $53,63 \pm 10,29\%$ de células viáveis foram recuperadas. O efeito de E-2 sobre esta linhagem foi mantido durante 2 e 4 dias após

a retirada do tratamento, sendo recuperadas respectivamente $39,13 \pm 3,89\%$ e $11,60 \pm 7,60\%$ de células viáveis.

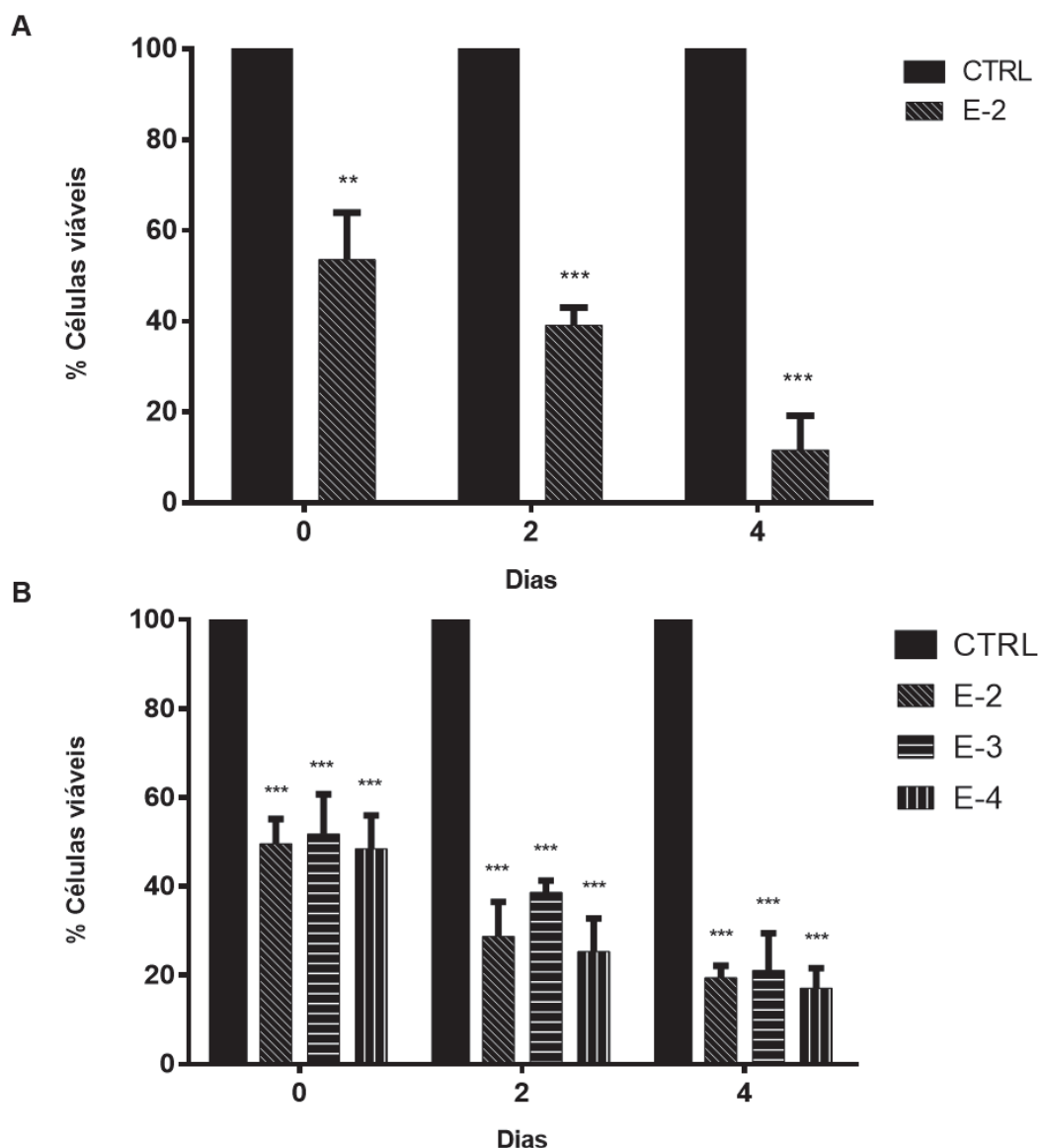


Figura 8. Porcentagem de células viáveis recuperadas em relação ao controle nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 após 72 h de tratamento com extratos de *L. pacari*, e dois e quatro dias após a retirada do tratamento. **(A)** Porcentagem das células viáveis da linhagem MCF-7 tratadas com E-2 em relação ao controle. **(B)** Porcentagem de células viáveis da linhagem MDA-MB-231 tratadas com E-2, E-3 e E-4 em relação ao controle. (*), (**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e de $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL).

FONTE: O Autor (2019).

Para a linhagem MDA-MB-231 (Figura 8-B), a CI_{50} dos extratos E-2, E-3 e E-4 reduziram a viabilidade em cerca de 50% em relação ao controle ($49,56 \pm 5,60\%$ para E-2; $51,76 \pm 9,01\%$ para E-3 e $48,45 \pm 7,52\%$ para E-4), confirmando também o resultado encontrado pelo ensaio do MTT. O efeito dos extratos se manteve após a retirada do tratamento, observando $28,70 \pm 7,82\%$ para E-2; $38,63 \pm 2,70\%$ para E-3

e $25,00 \pm 7,47\%$ para E-4 de células viáveis recuperadas no dia 2 e $19,47 \pm 2,69\%$ para E-2; $21,06 \pm 8,43\%$ para E-3 e $17,05 \pm 4,57\%$ para E-4 no dia 4.

A manutenção do efeito tempo-dependente dos extratos mesmo após a retirada do tratamento pode ser um indicativo de que a CI_{50} dos extratos testados exerce efeito citotóxico sobre as linhagens tumorais de mama, uma vez que por definição, se os extratos exercessem efeito antiproliferativo nessas concentrações, após a retirada do tratamento, seria observada a recuperação da capacidade proliferativa das células, e consequente aumento da porcentagem das células viáveis detectadas comparados com a porcentagem de células contadas no dia zero (RIXE; FOJO, 2007).

5.2.3 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico)

Os extratos mais promissores quanto à seletividade também foram avaliados pelo ensaio de formação de colônias. Este ensaio tem por objetivo determinar a capacidade de uma célula em proliferar indefinidamente, mantendo sua capacidade reprodutiva para formar uma colônia e é utilizado para avaliar o efeito de agentes quimioterápicos com potencial aplicação na clínica (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005).

Através da curva de sobrevivência celular é possível definir a relação entre a concentração do agente utilizado para promover a injúria e a fração de células que mantém a capacidade de proliferação, sendo esta uma informação adicional, não fornecida pelo ensaio da redução do sal MTT, o qual avalia apenas a viabilidade celular durante o período de tratamento estabelecido (CAMPLIN et al., 1991; MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005). Ainda, devido à utilização de uma menor densidade celular, o ensaio de formação de colônias permite, de maneira geral, distinguir os efeitos exercidos pelos extratos, podendo classificá-los em citotóxico ou antiproliferativo (inibição do crescimento) (BOYD, 1997). Isso é possível partindo do princípio de que, por definição, se o extrato for predominantemente citotóxico a célula não será capaz de gerar clones, logo o efeito é percebido ao final do experimento ao examinar o número de colônias em relação ao controle. O efeito antiproliferativo é percebido observando a manutenção do número das colônias e a diferença apenas na área das mesmas em relação ao controle, indicando que durante o período de

tratamento, este foi capaz de inibir a proliferação, porém após a retirada do mesmo, as células retomam sua capacidade proliferativa (RIXE; FOJO, 2007).

Para MCF-7 tratada com o E-2 (Figura 9), as concentrações 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$ demonstraram exercer efeito antiproliferativo, uma vez que foi observada diferença significativa apenas na área das colônias em relação ao controle. As demais concentrações (8-32 $\mu\text{g/mL}$) exerceram efeito significativo sobre os dois parâmetros avaliados, sugerindo efeito citotóxico. É digno de nota que a concentração do CI_{50} de extrato E-2 encontrada no ensaio da redução do sal MTT (24 $\mu\text{g/mL}$), compreendida entre 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$, pode exercer efeito significativo sobre área e número de colônias, uma vez que a concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de reduzir em 86,68% a área ocupada pelas colônias e em 91,77% o número das colônias comparado ao controle, e a concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de reduzir em 98,55% a área ocupada pelas colônias no poço e em 98,54% o número de colônias em relação ao controle. Esses resultados corroboram com a sugestão de efeito citotóxico da CI_{50} de E-2 sobre as células MCF-7 feita a partir do resultado do ensaio de simples contagem.

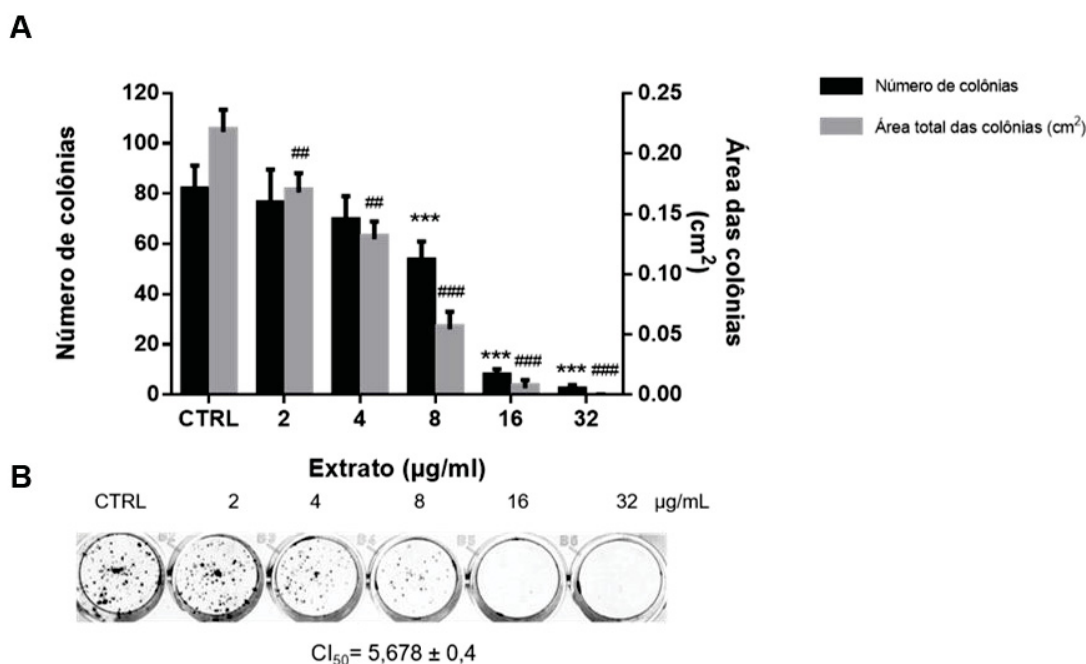


FIGURA 9. Número e área (cm^2) das colônias de MCF-7 tratadas com E-2 por 72 horas. **(A)** Número e área total das colônias por poço, tratadas com E-2 nas concentrações entre 2 - 32 $\mu\text{g/mL}$. **(B)** Imagem das colônias de MCF-7 após a coloração com cristal violeta e valor de CI_{50} calculado a partir da área das colônias. (*), (**) e (***) denotam diferença estatística de $P < 0,05$, $P < 0,01$ e de $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao número de colônias do controle (CTRL). (#), (##) e (###) denotam diferença estatística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e de $p < 0,001$, respectivamente, em relação à área total de colônias do controle (CTRL). FONTE: O Autor (2019).

Para MDA-MB-231 tratada com os E-2, E-3 e E-4 (Figura 10), apenas a menor concentração (2 µg/mL) dos extratos testados parece exercer atividade antiproliferativa, observando-se diferença apenas na área das colônias. As demais concentrações dos três extratos, incluindo a CI_{50} calculada pelo método do MTT (cerca de 16 µg/mL) sugerem efeito citotóxico, afetando significativamente a área e o número das colônias em comparação com o controle. Na concentração de 16 µg/mL o E-2 reduziu 97,52% em área e 95,10% em número de colônias, E-3 reduziu 98,67% em área e 95,29% em número de colônias, e E-4 reduziu 94,33% em área e 91,63% em número de colônias em comparação ao controle. Os extratos não apresentaram diferença significativa entre os CI_{50} calculado neste ensaio para linhagem MDA-MB-231 (E-2 = $4,411 \pm 0,4$ µg/mL, E-3 = $4,399 \pm 0,5$ µg/mL e E-4 = $4,596 \pm 0,8$ µg/mL), corroborando com os dados encontrados para o ensaio da redução do sal MTT e ensaio de simples contagem. Isso fica evidente na Figura 11, a qual mostra que o perfil de resposta das células aos tratamentos é semelhante em relação a área e número de colônias. De maneira geral, todos os extratos inibiram significativamente a atividade proliferativa das células em relação ao controle a partir da concentração de 2 µg/mL.

Considerando os valores de CI_{50} de extrato E-2 calculados neste ensaio para MCF-7 ($CI_{50} = 5,678 \pm 0,4$) e MDA-MB-231 ($CI_{50} = 4,411 \pm 0,4$), é possível notar que uma concentração significativamente maior de extrato é requerida para se atingir o mesmo efeito nas células MCF-7 em comparação à MDA-MB-231 ($p=0,0179$). Este resultado corrobora com o encontrado anteriormente no ensaio da redução do sal MTT, que apontava uma maior sensibilidade da linhagem MDA-MB-231 ao extrato E-2.

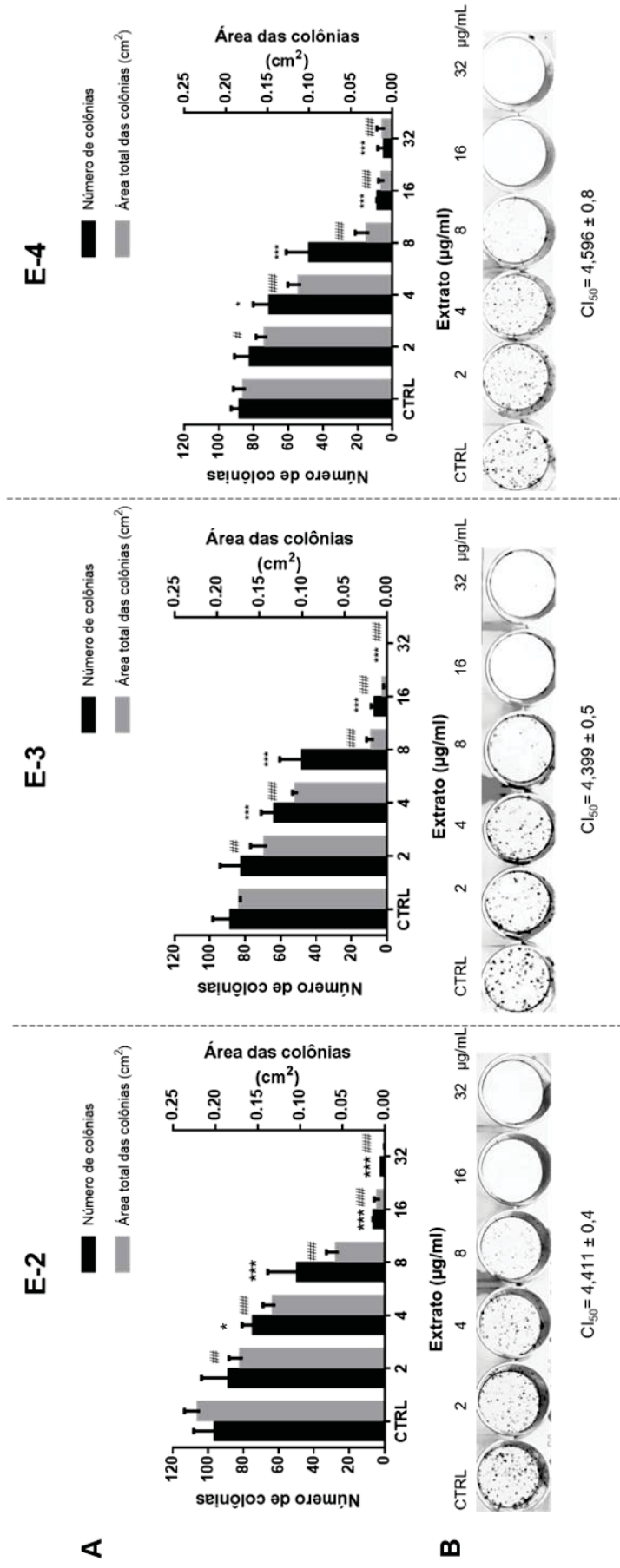


Figura 10. Número e área (cm²) das colônias de MDA-MB-231 tratadas com E-2, E-3 e E-4 por 72 horas. **(A)** Número e área total das colônias por poço, tratadas com E-2, E-3 e E-4 nas concentrações entre 2 - 32 µg/mL. **(B)** Imagens das colônias de MDA-MB-231 após a coloração com cristal violeta e valores de CI₅₀ calculados a partir da área das colônias. (*), (**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e de $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao número de colônias do controle (CTRL). (#), (##) e (###) denotam diferença estatística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e de $p < 0,001$, respectivamente, em relação à área total de colônias do controle (CTRL).
FONTE: O Autor (2019).

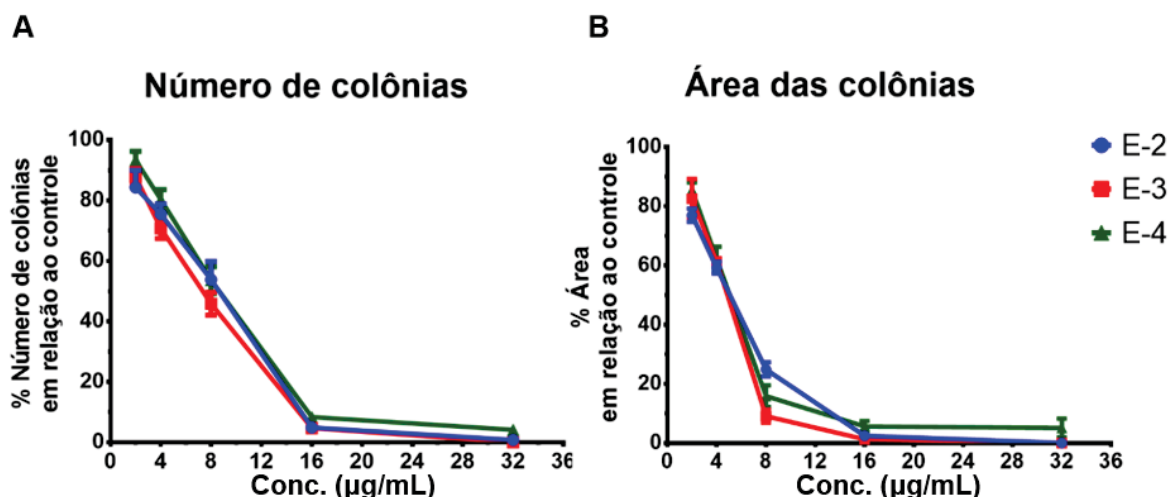


Figura 11. Comparação entre o efeito dos extratos E-2, E-3 e E-4 em células MDA-MB-231. Perfil de resposta comparativa dos efeitos dos extratos E-2, E-3 e E-4 sobre células MDA-MB-231 em termos de porcentagem do número de colônias (**A**) e área das colônias em relação ao controle (**B**).

FONTE: O Autor (2019).

Conforme pode ser observado na Figura 12, as concentrações de 2 e 4 µg/mL dos extratos E-2 e E-4 não exerceram efeito sobre a capacidade proliferativa das células não tumorais (McCoy) quanto aos parâmetros analisados. Por outro lado, E-3 apresentou um indicativo de efeito antiproliferativo na concentração de 2 µg/mL, devido à redução na área das colônias em comparação ao controle (15,92% para área e apenas 2,53% em número). Já na concentração de 4 µg/mL além do efeito sobre a área da colônia (16,40%), E-3 também exerceu efeito reduzindo o número das colônias (16,17%) em relação ao controle. A partir da concentração de 8 µg/mL, todos os extratos reduziram o número e a áreas das colônias, sugerindo então efeito citotóxico. Contudo, a Figura 13 evidencia que o efeito foi significativamente mais brando nas células tratadas com E-2, refletindo em um valor de CI_{50} maior quando comparado aos outros extratos testados (E-2= $9,115 \pm 0,9$ µg/mL, E-3= $6,378 \pm 0,4$ µg/mL e E-4 $7,099 \pm 0,8$ µg/mL), resultando em valores de $p=0,0086$ quando comparado ao CI_{50} do E-3 e $p=0,0320$ comparado ao E-4.

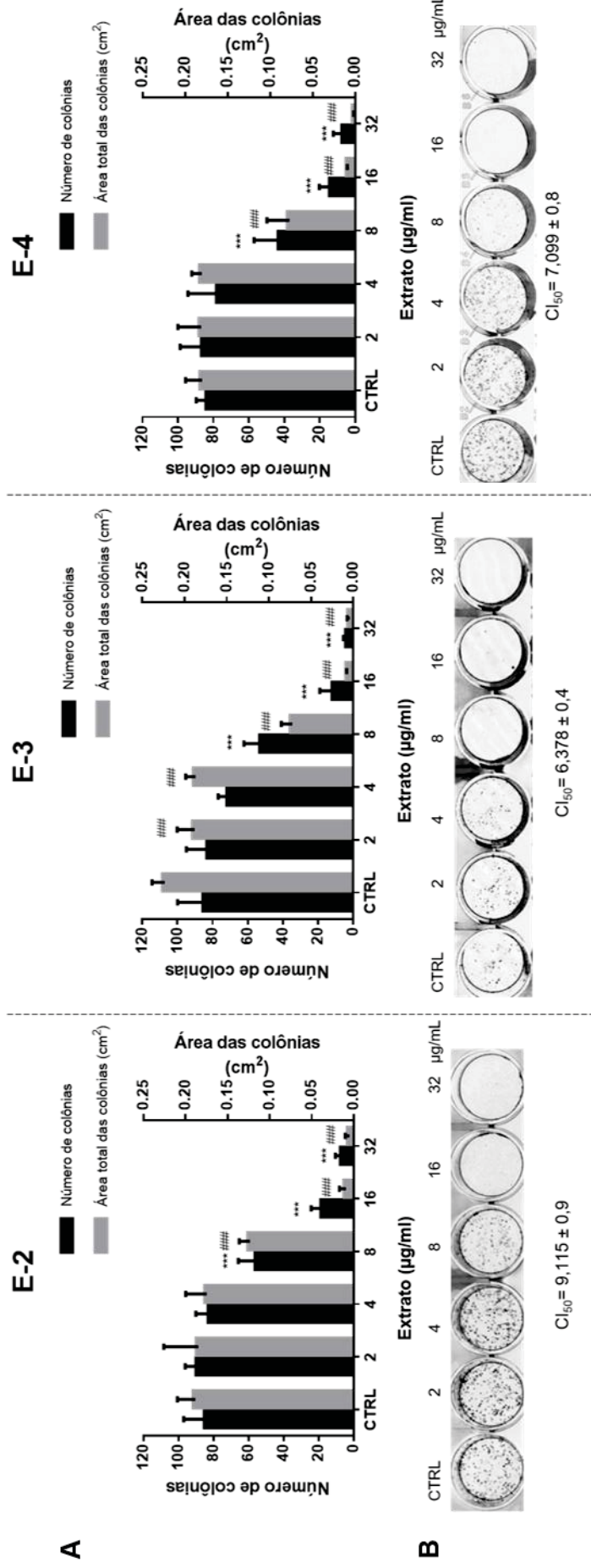


Figura 12. Número e área (cm²) das colônias de McCoy tratadas com E-2, E-3 e E-4 por 72 horas. **(A)** Número e área total das colônias por poço, tratadas com E-2, E-3 e E-4 nas concentrações entre 2 - 32 µg/mL. **(B)** Imagens das colônias de McCoy após a coloração com cristal violeta e valores de Cl₅₀ calculados a partir da área das colônias. (*), (**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e de $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao número de colônias do controle (CTRL). (#), (##) e (###) denotam diferença estatística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e de $p < 0,001$, respectivamente, em relação à área total de colônias do controle (CTRL).
FONTE: O Autor (2019).

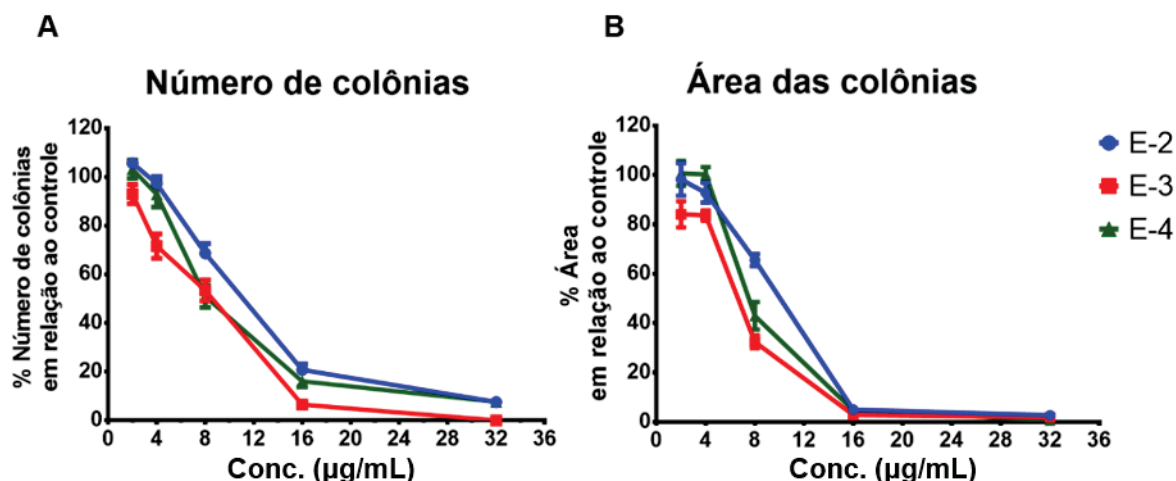


Figura 13. Comparação entre o efeito dos extratos E-2, E-3 e E-4 em células McCoy. Perfil de resposta comparativa dos efeitos dos extratos E-2, E-3 e E-4 sobre células McCoy em termos de porcentagem do número de colônias **(A)** e área das colônias **(B)** em relação ao controle.
 FONTE: O Autor (2019).

Analisando o efeito dos extratos de *L. pacari*, observou-se que todos foram capazes de inibir a formação de colônias de maneira concentração-dependente quando comparado ao grupo controle nas linhagens tumorais e não-tumoral. Os resultados apresentados corroboram com o perfil de resposta das células HRT-18 tratadas com concentrações entre 1,9 e 20 µg/mL de extrato metanólico das cascas do caule de *L. pacari* encontrado por Reichert (2018).

Alguns autores defendem que uma mesma substância pode exercer efeito citotóxico e antiproliferativo dependendo da concentração, conforme observado neste experimento. Isso é possível porque dependendo da concentração a mesma substância pode afetar diferentes fases do ciclo celular. Assim, uma vez que possa estar relacionado à uma fase específica do ciclo celular, o efeito citotóxico não é observado em todas as concentrações (RIXE; FOJO, 2007). Um exemplo de perfil de resposta semelhante à observada para os extratos de *L. pacari* é a daunorrubicina, quimioterápico inibidor da topoisomerase II, que tem efeito diferencial dependendo da concentração. Em baixas concentrações é antiproliferativo devido à parada do ciclo celular na fase G2-M e citotóxico em concentrações mais altas, onde há parada na fase G1-S (STEIN et al., 2003; LUPI et al., 2004; RIXE; FOJO, 2007).

Marcondes e colaboradores (2014) relataram que o extrato metanólico das cascas do caule de *L. pacari* na concentração de 1000 µg/mL levam à parada do ciclo celular na fase G0/G1 e consequente apoptose de células U-937. Os autores também indicaram que a concentração de 10 µg/mL do extrato induzem apoptose nas

linhagens HRT-18, SH-SY5Y e HeLa. Para confirmar o mecanismo de ação dos extratos de *L. pacari* sobre as linhagens utilizadas no presente trabalho, faz-se necessário a realização de estudos aprofundados com relação à interferência no ciclo celular e mecanismos de morte envolvidos neste processo.

Nota-se ainda que os valores de CI_{50} calculados no ensaio clonogênico são diferentes dos obtidos pelo método do MTT. Segundo Banasiak e colaboradores (1999) dependendo da linhagem celular e do tipo da injúria aplicada é possível haver discrepâncias nos valores de CI_{50} calculados por métodos diferentes. No caso de ensaios de citotoxicidade, como o MTT, a mensuração das células viáveis é feito por meio da avaliação de sua capacidade metabólica. Já no ensaio clonogênico, são consideradas as células que mantém a capacidade de gerar clones (colônias). Neste método, células viáveis que perdem o potencial proliferativo ou apresentam este desacelerado, formando colônias com menos de 50 células não são contabilizadas (FRANKEN et al., 2006).

Para a manutenção da integridade e da função dos tecidos normais (não-tumorais) é importante que as células mantenham a capacidade de proliferação mesmo frente a exposição do agente quimioterápico. Em contrapartida, o ideal esperado para as células tumorais é que estas percam a capacidade de se proliferar descontroladamente, prevenindo assim a recorrência do tumor (FRANKEN et al., 2006). Para tanto, o índice de seletividade (IS) também foi calculado baseado nos CI_{50} obtidos por meio do ensaio de formação de colônias (clonogênicos) (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) determinados para os extratos E-2, E-3 e E-4 em linhagens McCoy, MDA-MB-231 e MCF-7 pelo ensaio clonogênico e seus respectivos índices de seletividade

Extrato	McCoy	MDA-MB-231		MCF-7	
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
E-2	$9,115 \pm 0,9$	$4,411 \pm 0,4$	2,07	$5,678 \pm 1,0$	1,3
E-3	$6,378 \pm 0,4$	$4,339 \pm 0,5$	1,47	-	-
E-4	$7,099 \pm 0,6$	$4,596 \pm 1,0$	1,54	-	-

FONTE: O Autor (2019).

O IS calculado no ensaio clonogênico demonstrou que o extrato E-2 é o mais seletivo dentre os três extratos testados em MDA-MB-231, apresentando um $IS = 2,07$, enquanto o índice de seletividade para E-3 foi de 1,47 e para E-4 de 1,54. Este ensaio demonstrou também a manutenção da capacidade proliferativa das células normais

após o período de tratamento. Koch e colaboradores (2005) defendem que quanto maior o IS, mais promissor é o extrato, devido ao seu efeito seletivo e sugere que o índice de seletividade deva ser maior ou igual a 2 a fim de se estabelecer uma margem de segurança que garanta a atividade do extrato, evitando que o mesmo possa ter ação tóxica.

Adicionalmente, cabe ressaltar que para a linhagem MCF-7 testada com extrato E-2, o resultado para seletividade encontrado no ensaio clonogênico demonstrou uma elevação no valor do IS de 1,3 no MTT para 1,61, possivelmente devido à manutenção da capacidade proliferativa da linhagem normal frente ao tratamento, comparada à célula tumoral da linhagem em questão. Assim, dentre os extratos testados, o E-2 (MeOH:EtOH 50% v/v), por exercer efeito seletivo, pode ser considerado o de melhor escolha para ser acompanhado em estudos futuros utilizando linhagens de câncer de mama.

5.3 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO COMPOSIÇÃO-EFEITO

Os resultados obtidos através da execução dos ensaios do MTT, contagem celular e clonogênico, demonstraram claramente a atividade citotóxica/antiproliferativa seletiva de determinados extratos de *L. pacari* sobre células de carcinoma de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) quando comparado a células não tumorais, indicando a presença de compostos e/ou misturas desses que apresentam potencial antineoplásico. Um estudo quimiométrico utilizando a correlação composição *versus* efeito foi realizado a fim de relacionar os principais compostos dos 19 extratos com os efeitos demonstrados (CI_{50} calculado no ensaio da redução do sal MTT) sobre as células tumorais (MDA-MB-231 e MCF-7) e não tumoral (McCoy), conforme demonstrado na Figura 14.

As correlações, em sua grande maioria, não foram significativas, de modo que estas descrevem apenas uma tendência entre a presença dos compostos e a CI_{50} encontradas nesta análise. Isto se deve à alta correlação entre a composição química dos extratos, reflexo da alta semelhança dos mesmos, já demonstrado na Figura 5 e 7 e o efeito similar apresentado na Tabela 5.

Neste sentido, sugere-se que os picos referentes ao isômero de pedunculagina (3), substâncias não identificadas (11-13), Isômero de ácido hexosil elágico (15),

ácido O-deoxihexosil elágico (17), ácido elágico (18) e ácido O-galoil-deoxihexosil elágico (21) sejam alguns dos compostos responsáveis pelo efeito dos extratos de *L. pacari* observados sobre MDA-MB-231 (Figura 14). Os compostos relacionados com o efeito sobre as células MCF-7 evidenciados na Figura 14 foram elagitanino (6), isômero de punicalagina (8), catequina (9), não identificados (10-12), saponina (22) e triterpeno (24).

Apesar dos baixos valores do coeficiente de correlação (r), os compostos sugeridos ácido elágico, elagitanino, isômero de punicalagina, catequina, triterpeno e saponina presentes nos extratos de *L. pacari* já foram relacionados anteriormente com o efeito citotóxico sobre células HRT-18 por Reichert e colaboradores (2018). Os autores obtiveram resultados significativos por utilizarem frações obtidas do extrato metanólico das cascas de *L. pacari*, os quais apresentaram diferentes valores de CI_{50} , devido à composição química distinta.

Além disso, o ácido elágico e os elagitaninos tem sua atividade bastante relatada sobre células tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7, conforme já revisado no item 3.6. Considerando que o ácido elágico é um dos principais componentes do extrato e foi relacionado apenas com o efeito citotóxico/antiproliferativo sobre a linhagem MDA-MB-231, este resultado pode ser mais uma hipótese para explicar a diferença de sensibilidade entre as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 em relação aos extratos de *L. pacari* testados. Kim e colaboradores (2009) relataram que o ácido elágico exerce diferentes efeitos nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, sendo a linhagem triplo negativa mais sensível, corroborando como os resultados encontrados neste trabalho.

A relação do triterpeno e saponina dos extratos de *L. pacari* com o efeito citotóxico sobre células MCF-7 também tem sido relatada por outros autores quando estudam outras espécies vegetais, como os triterpenos do abacate (*Persea americana*), cascas de *Betula utilis* (MISHRA et al., 2016; ABUBAKAR; ACHMADI; SUPARTO, 2017) e as saponinas extraídas de *Zanthoxylum armatum*, *Albizia lebbek* e *Chlorophytum borivillianum* (DEORE; KHADABADI, 2010; ALAM et al., 2017; DESAI; JOSHI, 2019).

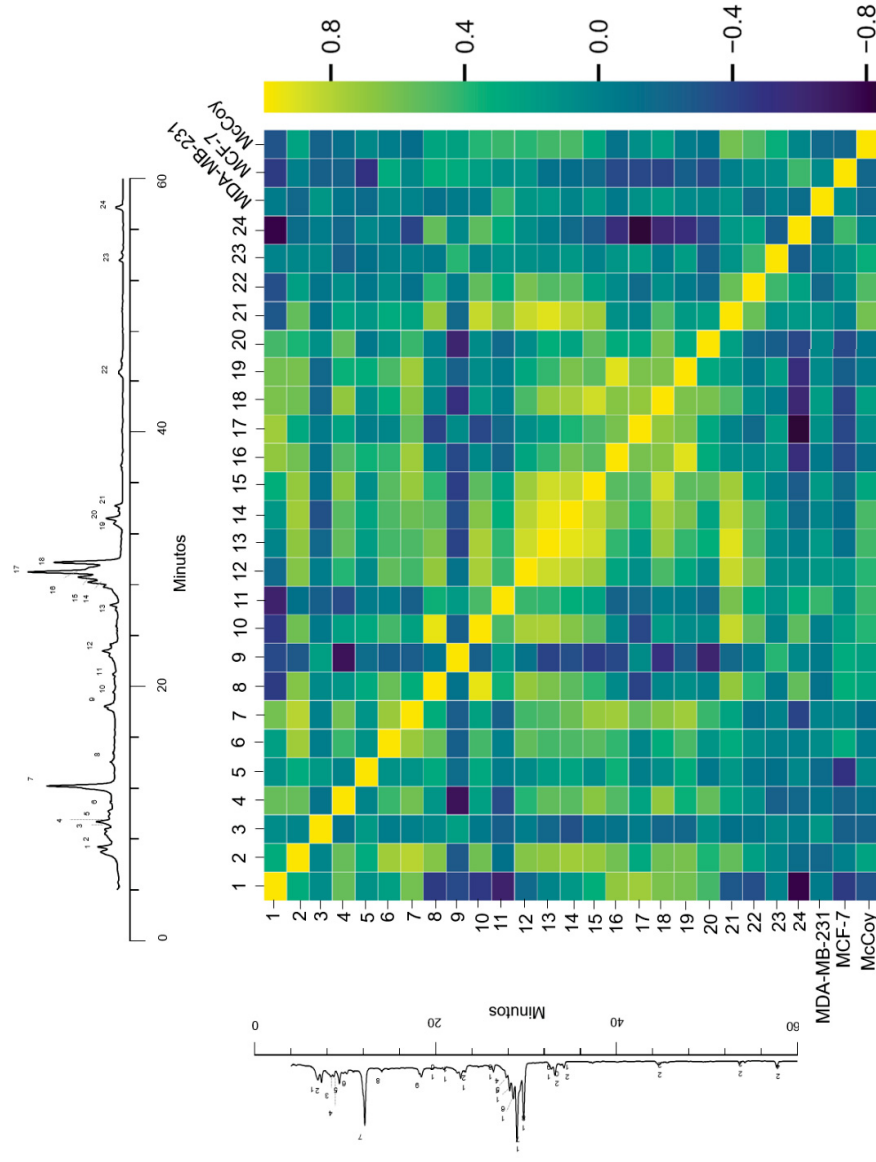


Figura 14. Matriz de correlação de Pearson entre os principais compostos identificados dos 19 extratos de *L. pacari* e a Cl_{50} dos extratos calculados pelo método do MTT das linhagens celulares MDA-MB-231, MCF-7 e McCoy, evidenciando os fatores de correlação (r) diretamente proporcionais com a diminuição do Cl_{50} . A escala de cores expressa a variação do fator de correlação, variando do amarelo (mais correlacionado) para azul escuro (menos correlacionado). (1) HHDP-O-hexosídeo, (2) Isômero de punicalina, (3) Isômero de pedunculagina, (4) O-galoil punicalina, (5) Elagitânico, (6) Elagitânico, (7-8) Isômero de punicalagina, (9) Catequina, (10-13) Não identificado, (14-15) Isômero de ácido hexosil elágico, (16) Ácido O-pentosil elágico, (17) Ácido O-deoxihexosil elágico, (18) Ácido elágico, (19) Ácido O-deoxihexosil O-metil elágico, (20) Ácido O-deoxihexosil O-metil elágico, (21) Ácido O-galoil-deoxihexosil elágico, (22) Saponinas, (23) Triterpenos e (24) Triterpenos.

FONTE: O Autor (2019).

As correlações negativas indicam que o aumento na área do pico resulta em uma maior Cl_{50} , o que é desejada para a linhagem celular normal (McCoy). Este efeito é observado para os picos 1 (HHDP-O-hexosídeo), 3 (isômero de pedunculagina), 4 (O-galoil punicalina), 6 (elagitanino), 7 (isômero de punicalagina), 16 (ácido O-pentosil elágico), 19 e 20 (ácido O-deoxihexosil O-metil elágico) e 24 (triterpeno). O aumento na área dos picos 3, 6 e 24 está relacionado com o aumento da Cl_{50} na célula normal e a diminuição desta para as células tumorais, corroborando com o efeito seletivo.

Analisando a composição dos extratos E-2, E-3 e E-4 com relação à área dos picos relacionados com o aumento da Cl_{50} nas células normais (McCoy), é possível observar que, com exceção dos picos 4 e 24, estes compostos estão presentes em uma maior concentração no extrato E-2 (MeOH:EtOH 50% v/v) (Figura 15) sugerindo a explicação do efeito mais seletivo do mesmo em comparação aos demais.

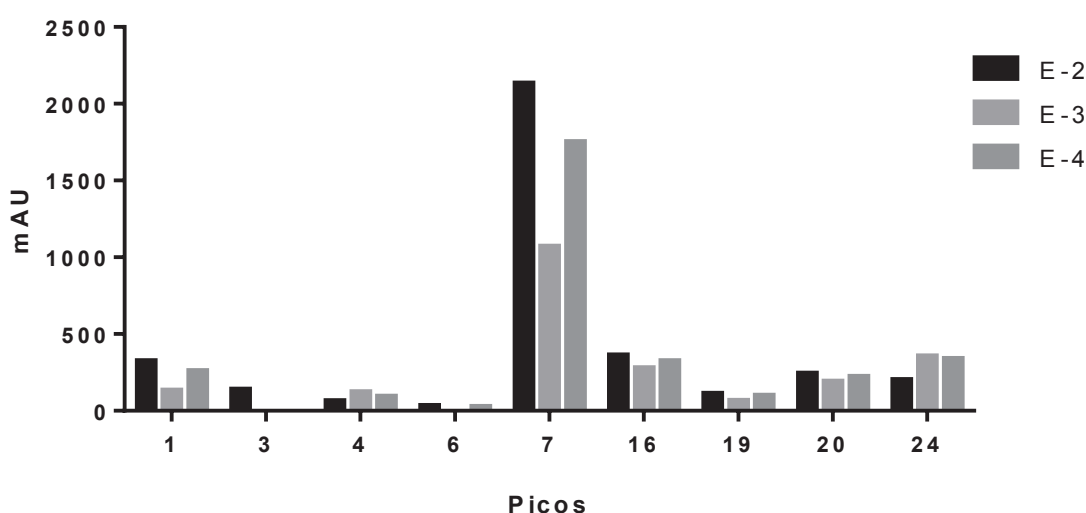


Figura 15. Comparação da área dos picos dos extratos E-2, E-3 e E-4 com potencial efeito de elevar o Cl_{50} das células da linhagem McCoy. (1) HHDP-O-hexosídeo; (3) Isômero de pedunculagina; (4) O-galoil punicalina; (6) Elagitanino; (7) Isômero de punicalagina; (16) Ácido O-pentosil elágico; (19) Ácido O-deoxihexosil O-metil elágico; (20) Ácido O-deoxihexosil O-metil elágico; (24) Triterpeno.

FONTE: O Autor (2019).

O resultado da análise de correlação apresentada corrobora com a sugestão de Marcondes e colaboradores (2014) e com os achados de Reichert e colaboradores (2018) de que a ação antitumoral dos extratos das cascas de *L. pacari* não deve ser atribuída apenas ao ácido elágico isoladamente, e sim a mistura de outras substâncias presentes no extrato.

5.4. CAPTAÇÃO DO EXTRATO E-2 PELAS CÉLULAS NORMAL E TUMORAL

Uma vez demonstrado o efeito citotóxico/antiproliferativo dos extratos de *L. pacari* sobre as células de câncer de mama, e levando em consideração que os extratos são compostos majoritariamente por ácido elágico, seus derivados e taninos hidrolisáveis, a internalização do extrato E-2 (MeOH:EtOH 50% v/v) foi avaliada sobre células das linhagens MDA-MB-231 (tumoral) e McCoy (não tumoral), a fim de avaliar como a captação e a metabolização de tais compostos estão relacionadas com os efeitos observados.

Para a realização destes estudos, foi selecionada a concentração de 100 µg/mL do extrato E-2 e ácido elágico, por esta preliminarmente não exercer efeito sobre a morfologia e confluência das células em comparação ao controle nos períodos de tempo utilizado (dados não demonstrados). Estudos de alterações fenotípicas dessas células serão melhores investigados através do uso de técnicas microscópicas mais avançadas e corantes específicos.

Reichert (2018) demonstrou que o extrato metanólico de *L. pacari* (100 – 1000 µg/mL) apresentou um efeito concentração-dependente na redução do número de células leucêmicas viáveis (U-937) quando expostas ao tratamento por 24 h com 88,8% de recuperação celular na concentração de 100 µg/mL. Além disso, o método cromatográfico utilizado nesse estudo foi capaz de detectar as substâncias presentes no extrato, mesmo em baixas concentrações, livre no meio de cultura e intracelularmente.

Após 2 horas de incubação do extrato E-2 em meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) sem presença celular foi possível observar no cromatograma obtido por CLAE-DAD (Figura 16) a ausência dos picos referentes aos elagitaninos do extrato, como os isômeros punicalina, pedunculagina e punicalagina (tempos de retenção entre 7,01 e 14,07 minutos). Isso pode ser explicado devido à precipitação, degradação ou ligação às proteínas do ambiente (meio de cultura) (LIPÍŃSKA; KLEWICKA; SÓJKA, 2014) ou pela hidrólise dessas substâncias, resultando em ácido elágico (LARROSA; TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2006), demonstrando que os elagitaninos não são captados pelas linhagens celulares utilizadas nesse estudo *in vitro*.

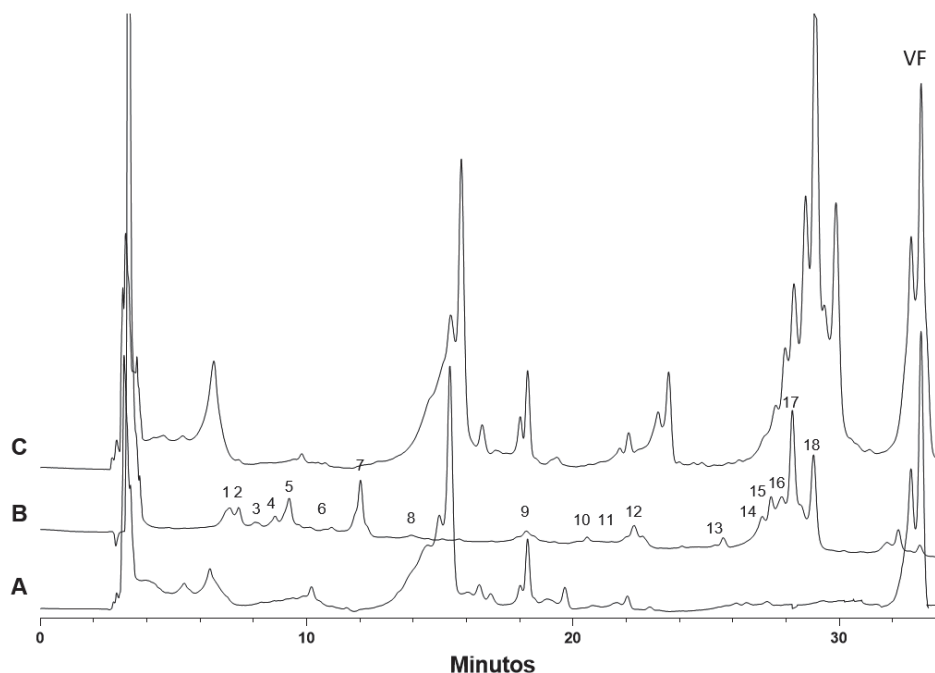


Figura 16. Cromatograma do extrato E-2 (100 µg/mL) incubado em meio de cultura (RPMI 1640) por 2 h. **(A)** Cromatograma CLAE-DAD do meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,4) na ausência do extrato E-2, evidenciando a presença de vermelho de fenol (VF); **(B)** Cromatograma CLAE-DAD do E-2 (100 µg/mL) diluído em metanol (sem meio de cultura RPMI 1640) evidenciando os compostos do extrato: (1) HHDP-O-hexosídeo, (2) Isômero de punicalina, (3) Isômero de pedunculagina, (4) O-galoil punicalina, (5) Elagitanino; (6) Elagitanino, (7-8) Isômero de punicalagina, (9) Catequina, (10) NI, (11-13) NI, (14-15) Isômero de ácido hexosil elágico, (16) Ácido O-pentosil elágico, (17) Ácido O-deoxihexosil elágico, (18) Ácido elágico; **(C)** Cromatograma CLAE-DAD do E-2 (100 µg/mL) incubado em meio de cultura (pH 7,4) evidenciando a ausência dos picos referentes aos elagitaninos do extrato e a presença de vermelho de fenol (VF).
FONTE: O Autor (2019).

O resultado encontrado corrobora com a ausência dos picos correspondentes aos elagitaninos presentes no cromatograma do meio de cultura recuperado após incubação de 24 horas com células U-937 e extrato metanólico de *L. pacari* nas concentrações de 100 e 500 µg/mL por 24 horas observado por Reichert (2018).

Estudos *in vitro* demonstraram que os elagitaninos são estáveis em HCl pH 1,8 - 2,0, semelhante ao ácido gástrico, e na presença de enzimas gástricas como pepsina, renina e lipases gástricas, não sofrendo hidrólise e nem produção de ácido elágico nessas condições (HASLAM, 2009). Os elagitaninos também resistem às enzimas pancreáticas e aos sais biliares e são transportados ao duodeno e ao intestino delgado, onde o pH é mais elevado (pH 7,1 a 8,4), favorecendo a hidrólise e posterior conversão a ácido elágico (LARROSA et al., 2010; LIPÍŃSKA; KLEWICKA; SÓJKA, 2014). Portanto, o pH do meio de cultura (RPMI 1640) utilizado no estudo

(pH 7,4) está ocasionando a hidrólise prévia dos elagitaninos presentes no extrato E-2, ocorrendo conforme descrito por Larrosa e colaboradores (2006) (Figura 17).

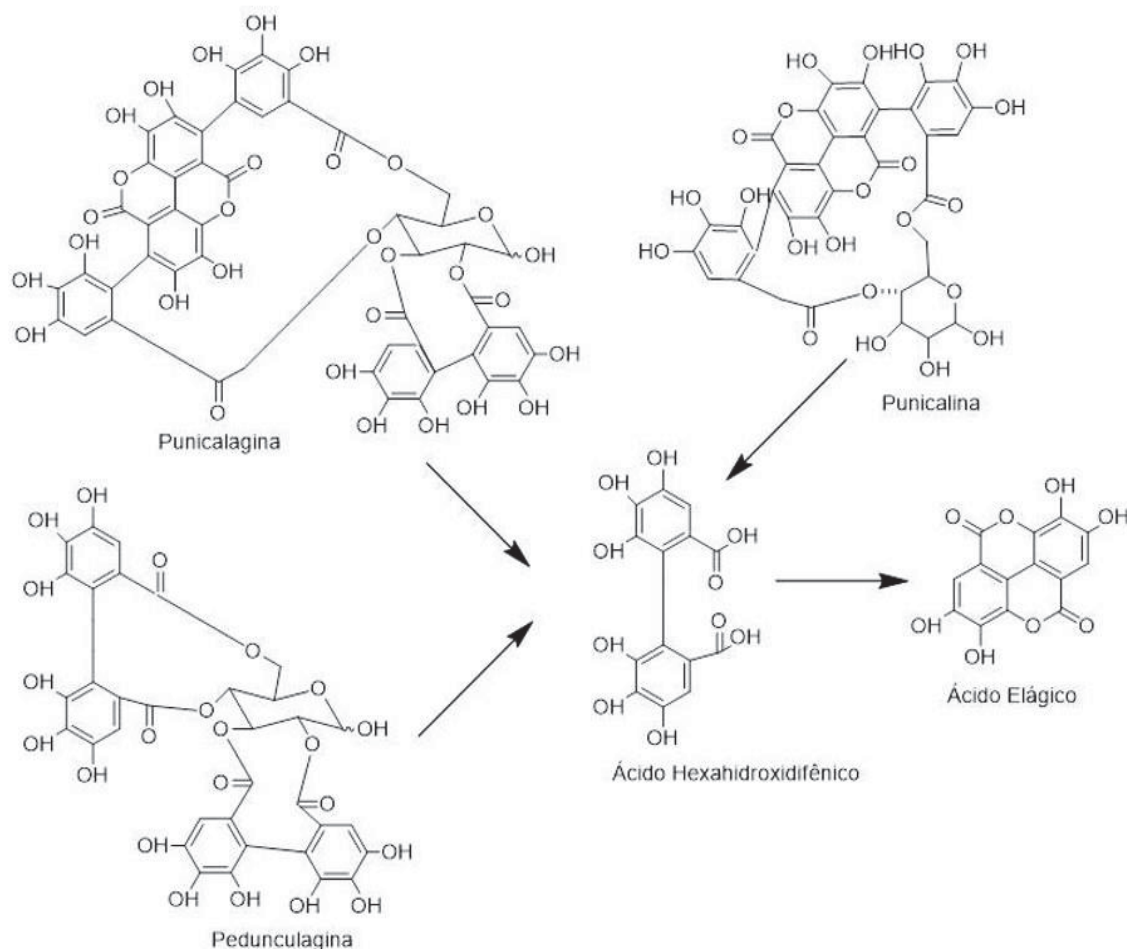


Figura 17. Representação da hidrólise dos principais elagitaninos do extrato E-2 de *Lafoensia pacari* incubado por 2 h em meio de cultura (RPMI 1640, pH 7.4) resultando na formação do ácido hexahidroxidifênico que espontaneamente desidrata formando uma dilactona de ácido gálico estável (ácido elágico).

FONTE: Adaptado por Larrosa; Tomás-Barberán; Espín (2006).

Para Zucker (1983) os taninos hidrolisáveis podem ser considerados como poliésteres da glicose, podendo ser classificados em duas categorias: galotaninos, que por hidrólise ácida liberam ácido gálico e seus derivados; e elagitaninos, que por hidrólise liberam os ácidos valônico e elágico, sendo esse último o mais importante e demonstrado no extrato E-2 de *Lafoensia pacari*.

Considerando que o entendimento do processo de absorção e metabolismo dessas substâncias *in vitro* é essencial na avaliação de seus efeitos, a captação do extrato E-2 foi avaliada na linhagem tumoral MDA-MB-231 e na linhagem não tumoral

(McCoy). As células foram incubadas em meio de cultura contendo 100 µg/mL do extrato E-2, e as análises foram realizadas após 2, 6 e 24 horas de incubação para MDA-MB-231 e de 2 e 6 horas para McCoy. Esses tempos foram escolhidos baseado no trabalho de Larrosa e colaboradores (2006), os quais demonstraram que a célula Caco-2 (carcinoma colorretal) é capaz de captar o ácido elágico a partir de 2 horas.

Foi possível observar na Figura 18.B que no tempo de 2 horas de incubação utilizando o extrato E-2, após lise celular e análise por CLAE-DAD, o ácido elágico ($t_R = 29,75$ min) já pode ser encontrado no interior das células da linhagem MDA-MB-231. A internalização celular após 6 horas de tratamento com o extrato E-2 (100 µg/mL) (Figura 18.C) demonstrou um aumento da quantidade de ácido elágico além do aparecimento de seus derivados glicosilados ($t_R = 27,85$ min). O tempo de 24 horas de tratamento foi avaliado a fim de verificar se ainda haveria componentes do extrato E-2 no interior das células tumorais MDA-MB-231. O cromatograma demonstrou que o ácido elágico e derivados glicosilados ainda estavam presentes no lisado celular (Figura 18.D). Quando as células tumorais foram incubadas com 100 µg/mL do padrão de ácido elágico, este foi captado e apareceu no lisado em um tempo de retenção semelhante ao dos componentes encontrados no extrato de *L. pacari* (Figura 18.E), confirmando a identificação das substâncias internalizadas pela linhagem MDA-MB-231.

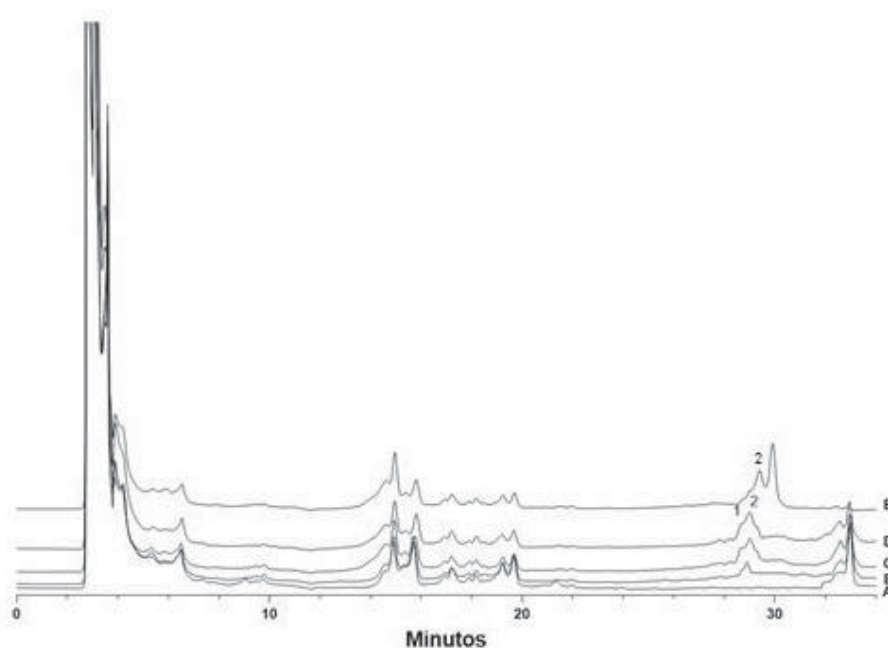


Figura 18. Cromatograma obtido por CLAE-DAD dos lisados das células MDA-MB-231 incubados com extrato E-2. **(A)** Lisado das células controle, incubadas sem a presença de E-2. **(B)** Lisado de células incubadas com 100 µg/mL de E-2 por 2 horas. **(C)** Lisado de células incubadas com 100 µg/mL de E-2 por 6 horas. **(D)** Lisado de células incubadas com 100 µg/mL de E-2 por 24 horas. **(E)** Lisado de células incubadas com 100 µg/mL de ácido elágico por 6 horas. (1) Derivados glicosilados do ácido elágico; (2) Ácido elágico.

FONTE: O Autor (2019).

A linhagem não tumoral também foi testada quando à capacidade de captar os componentes do extrato E-2. Conforme observado na Figura 19, não foram encontrados componentes do extrato no lisado das células da linhagem McCoy.

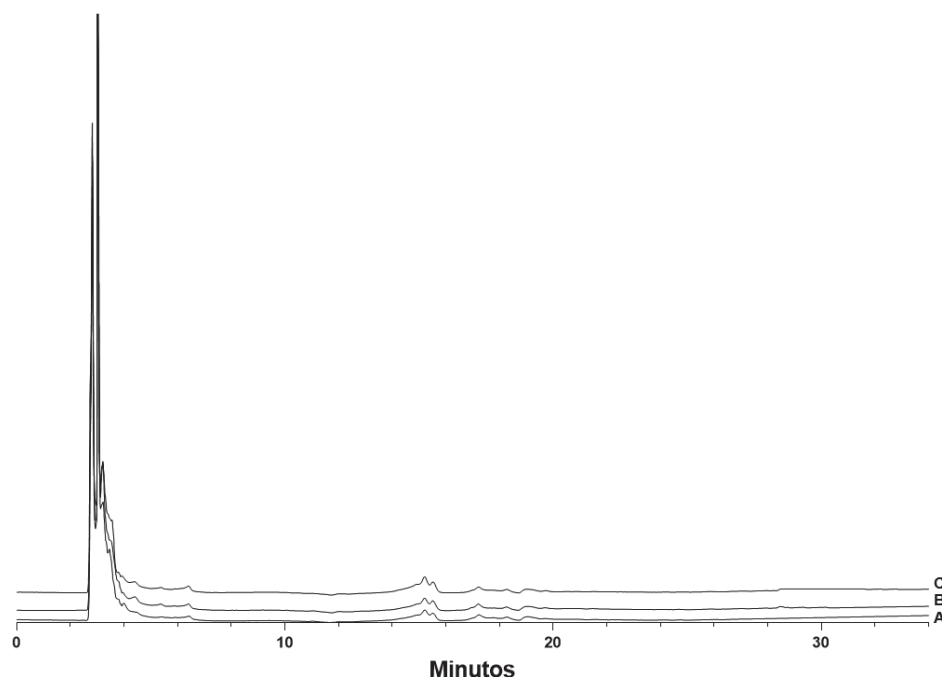


Figura 19. Cromatograma obtido por CLAE-DAD dos lisados das células McCoy incubados com extrato E-2. **(A)** Lisado das células controle, incubadas sem a presença de E-2. **(B)** Lisado de células incubadas com 100 µg/mL de E-2 por 2 horas. **(C)** Lisado de células incubadas com 100 µg/mL de E-2 por 6 horas.

FONTE: O Autor (2019).

Reichert (2018) não encontrou substâncias referentes ao extrato no interior das células leucêmicas U-937 tratadas com 100 µg/mL do extrato metanólico das cascas de *L. pacari* após 24 h, apenas foi detectado a presença de metabólitos no meio de cultura sugerindo que estes foram intracelularmente metabolizados e excretados. Além das células serem diferentes entre si, principalmente no metabolismo celular, a diferença no resultado pode ser devido ao método de lise utilizado no ensaio de captação, pois enquanto Reichert (2018) rompeu as células utilizando tampão de lise e posterior extração em fase sólida, nesse trabalho foi utilizado sonicação e metanol como solvente extrator conforme descrito por Larrosa e colaboradores (2006). É relatado que o ácido elágico é muito mais solúvel em metanol do que em água, um fator que pode interferir na extração dos compostos presentes intracelularmente, encontrados em baixa concentração (BALA, 2006).

Ainda sobre a diferença na biologia das linhagens celulares, Larrosa e colaboradores (2006) ao estudarem a captação do ácido elágico e punicalagina por células Caco-2, não encontraram ácido elágico livre no interior das células. A diferença metabólica entre as linhagens é evidenciada neste estudo, uma vez que

diferente das células Caco-2, no interior das células MDA-MB-231 foi encontrado ácido elágico na forma livre e a linhagem normal sequer foi capaz de internalizar os componentes do extrato E-2 nos tempos avaliados.

Cabe ressaltar que a pequena quantidade de ácido elágico e demais componentes relacionados ao extrato encontrada no sobrenadante do lisado celular em todos os tempos analisados pode ser devido à propriedade desses compostos de se ligar às proteínas e ao DNA, precipitando com estas estruturas e, portanto, não ficando disponível para ser detectado no CLAE (WHITLEY et al., 2003).

Após tratamento, o meio de cultura contendo extrato E-2 incubado com as células MDA-MB-231 (2, 6 e 24 horas) e McCoy (2 e 6 horas) foi analisado. Como pode ser observado na Figura 20, no meio de cultura contendo E-2 incubado na presença das células tumorais, os metabólitos excretados pela célula foram detectados em pequena quantidade ($t_R = 30,5$ min), entretanto não foram identificados. Já na linhagem não tumoral (McCoy) (Figura 21), uma vez que nos períodos de tempo incubados o extrato estudado não foi internalizado, não foram observados picos referentes a esses metabólitos no cromatograma.

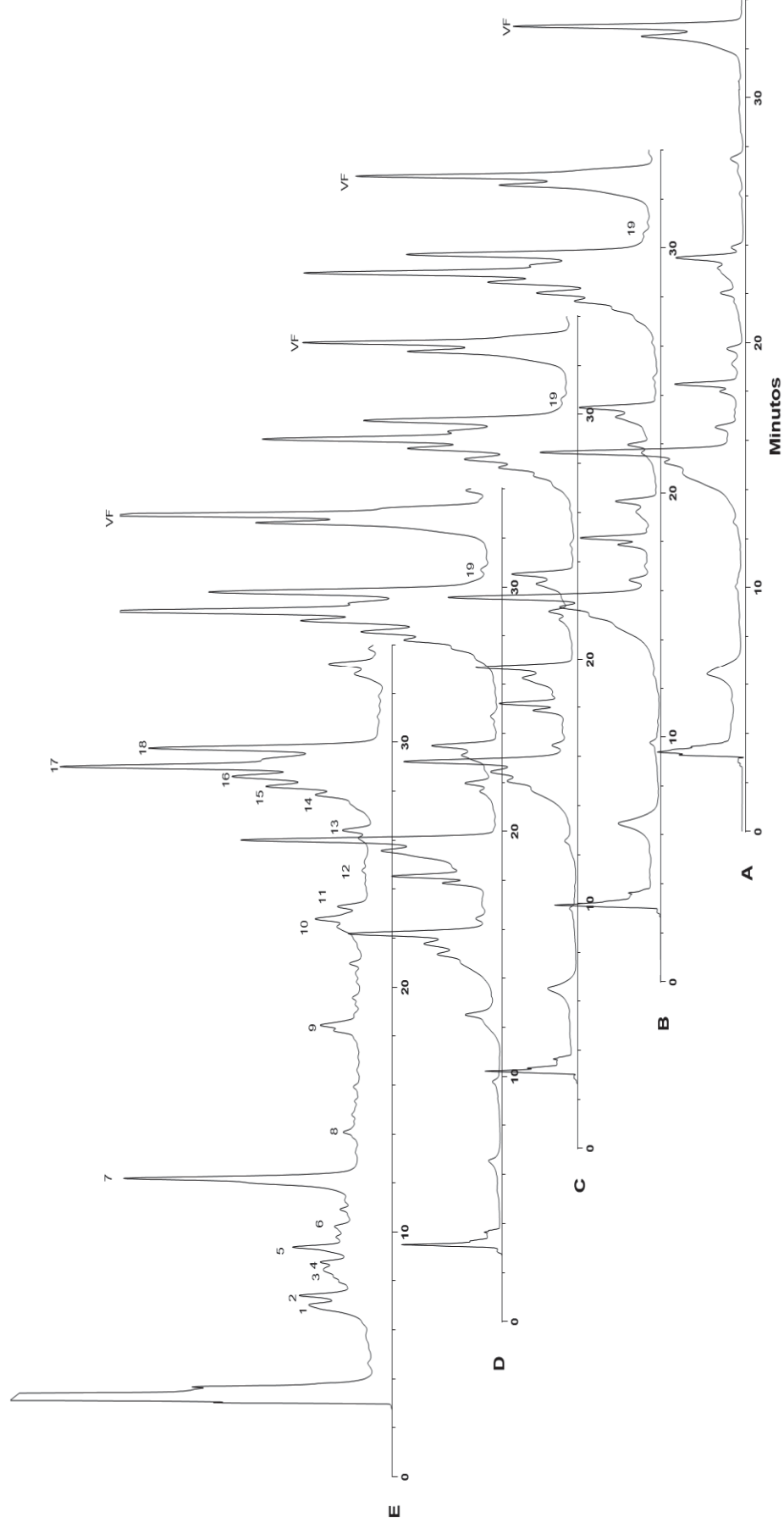


Figura 20. Cromatogramas obtidos por CLAE dos meios de cultura incubados com extrato E-2 (100 µg/mL) e células MDA-MB-231. **(A)** Controle incubado com MDA-MB-231 em meio de cultura na ausência de extrato. **(B)** Meio incubado com E-2 e MDA-MB-231 por 2 h. **(C)** Meio incubado com E-2 e MDA-MB-231 por 6 h. **(D)** Meio incubado com E-2 e MDA-MB-231 por 24 h. **(E)** Extrato E-2 100 µg/mL, evidenciando os compostos do extrato: (1) HHDP-O-hexosídeo, (2) Isômero de punicalina, (3) Isômero de pedunculagina, (4) O-galoi punicalina. (5) Elagitânico, (6) Elagitânico, (7-8) Isômero de punicalagina, (9) Catequina, (10-13) Não identificado, (14-15) Isômero de ácido hexosil elágico, (16) Ácido O-pentosil elágico, (17) Ácido O-deoxihexosil elágico, (18) Ácido elágico. O pico 19 marcado nos cromatogramas B, C e D do meio de cultura incubado com E-2 e células tumorais representa os produtos do metabolismo do E-2 após serem internalizados e excretados (Não identificado). VF: Vermelho de fenol. FONTE: O Autor (2019).

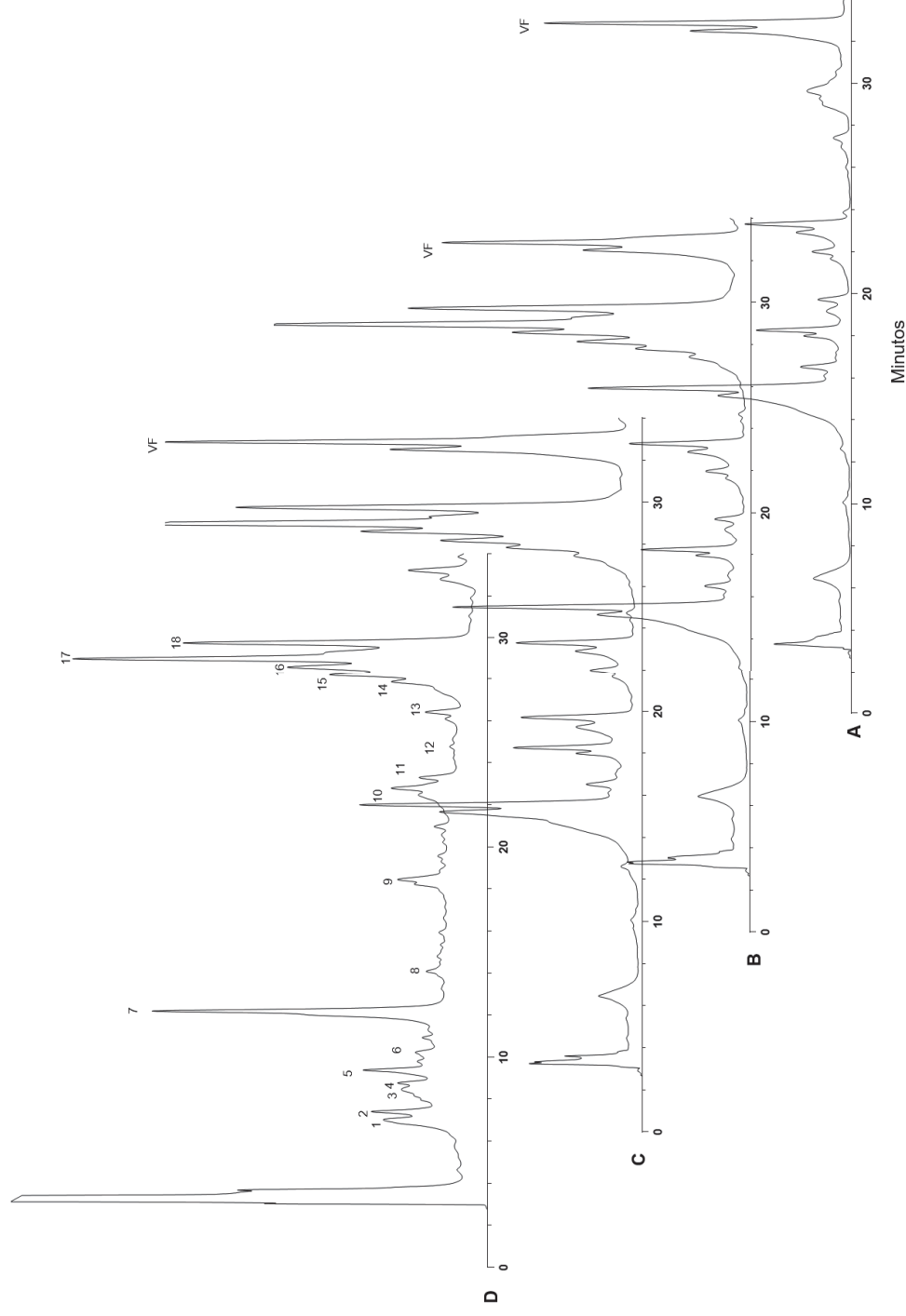


Figura 21. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos meios de cultura incubados com E-2 (100 µg/mL) e células McCoy. **(A)** Controle incubado com McCoy, em meio de cultura na ausência de extrato. **(B)** Meio incubado com E-2 e McCoy por 2 h. **(C)** Meio incubado com E-2 e McCoy por 6 h. **(D)** E-2 (100 µg/mL) evidenciando os compostos do extrato: (1) HHDP-O-hexosídeo, (2) Isômero de punicalina, (3) Isômero de pedunculagina, (4) O-galoi punicalina. (5) Elagitanino; (6) Elagitanino, (7-8) Isômero de punicalagina, (9) Catequina, (10-13) Não identificado, (14-15) Isômero de ácido hexosil elágico, (16) Ácido O-pentosil elágico, (17) Ácido O-deoxihexosil elágico, (18) Ácido elágico. VF: Vermelho de fenol.

FONTE: O Autor (2019).

Um pequeno pico com tempo de retenção semelhante ao dos metabólitos do extrato foi detectado no meio de cultura incubado com MDA-MB-231 e ácido elágico (Figura 22), corroborando com a hipótese de que estes sejam produtos do metabolismo do ácido elágico.

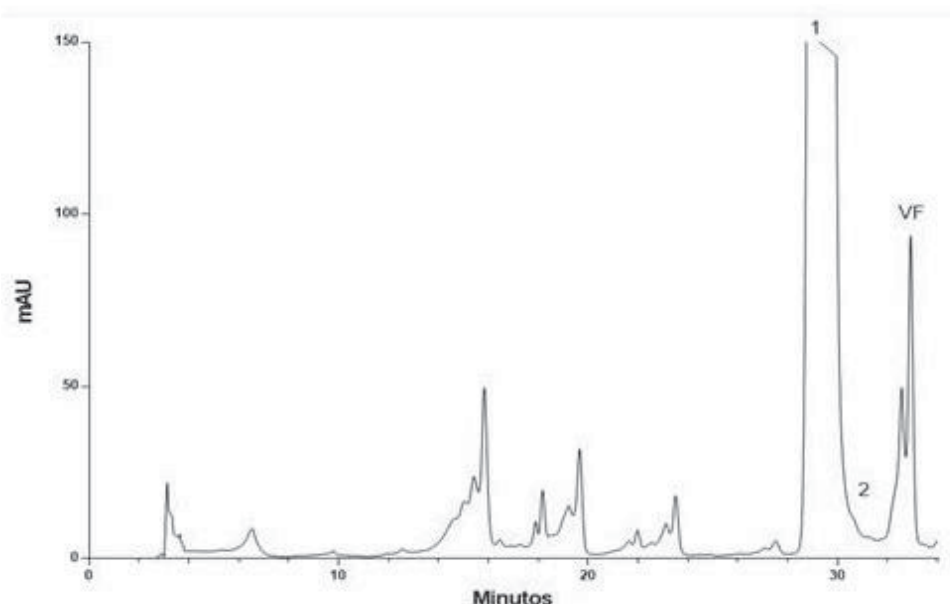


Figura 22. Cromatograma obtido por CLAE do meio de cultura incubado com ácido elágico (100 µg/mL) e células MDA-MB-231 por 6 horas evidenciando a presença do ácido elágico (1) no meio extracelular e a presença de pequeno pico (t_R = 30,5 min) correspondente aos metabólitos excretados (2). VF: Vermelho de fenol.
FONTE: O Autor (2019).

Além de evidenciar a presença do pico referente aos metabólitos excretados no meio de cultura pelas células tumorais, a Figura 20 demonstrou que a área do pico é diretamente proporcional ao tempo de incubação, sendo maior em 24 h. Também foram observados o desaparecimento dos picos referentes aos elagitaninos em ambos os meios de cultura incubados com células tumorais e não tumorais, conforme anteriormente demonstrado para o meio de cultura sem a presença de células.

Os resultados encontrados neste estudo para a linhagem tumoral corroboram com Reichert (2018), que detectou metabólitos do extrato metanólico das cascas de *L. pacari* no meio de cultura incubado com células U-937. A partir de uma comparação do perfil cromatográfico pode-se inferir que estes metabólitos presentes no meio de cultura incubado com células MDA-MB-231, sejam o ácido dimetil elágico e/ou seu derivado glucuronidado. Larrosa e colaboradores (2006) também descreveram que o ácido elágico livre presente no meio é rapidamente absorvido e metabolizado pelas

células Caco-2, biotransformado em derivados metilados, glucuronidados e sulfatados, os quais são excretados no meio de cultura onde podem ser detectados.

Lipińska e colaboradores (2014) relataram que o ácido elágico é absorvido pelas células do trato gastrointestinal e são rapidamente transformadas pela Catecol O-Metiltransferase (COMT). Diversos autores relataram que as células da linhagem MDA-MB-231 expressam essa enzima, evidenciando a capacidade de metabolizar o ácido elágico (YU et al., 2011; GRIMES et al., 2018).

Assim, é possível inferir que o metabolismo celular relativo aos componentes do extrato E-2 esteja relacionado com o efeito seletivo do extrato sobre as células tumorais (MDA-MB-231), uma vez que os experimentos demonstram que as células normais (McCoy) parecem não ter a capacidade de produzir estes metabólitos.

Os perfis cromatográficos dos meios de cultura recuperados tanto das células normais, quanto das tumorais revelam que os componentes do extrato E-2 não possuem a capacidade de atravessar livremente a membrana celular, ficando a maior parte retido no ambiente extracelular. Isso se deve ao caráter hidrofílico das substâncias identificadas no extrato. Enquanto substâncias lipofílicas atravessam livremente a membrana celular por difusão passiva, substâncias hidrofílicas necessitam ativar mecanismos carreadores, que possibilitam sua entrada no citoplasma (NELSON; COX, 2018).

Vários estudos têm sugerido que a internalização do ácido elágico pelas células ocorre por meio dos transportadores do tipo OATp (peptídeo transportador de ânions orgânicos) (WHITLEY; SWEET; WALLE, 2006; MAO et al., 2016). Alguns subtipos de OATp tem a expressão aumentada em células tumorais, incluindo a de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) em comparação com tecido e células normais (MCF-10A). A descoberta dessa alteração dos OATp's nos tecidos tumorais tem despertado um interesse no transporte de drogas anticâncer, visando um efeito seletivo. Através destes transportadores, compostos que interferem no crescimento e na sobrevivência celular são internalizados, incluindo drogas anticâncer clinicamente utilizadas, como o metotrexato e paclitaxel (OBAIDAT; ROTH; HAGENBUCH, 2012; ROTH; OBAIDAT; HAGENBUCH, 2012).

Wlcek e colaboradores (2008) relataram que células da linhagem tumoral estudada (MDA-MB-231) expressam transportadores da família OATp. Logo, o ácido

elágico e parte dos componentes do extrato E-2 podem estar sendo internalizados através destes receptores, entretanto, estudos adicionais são necessários a fim de confirmar esta hipótese, investigando também quais os subtipos desta classe de transportadores estão envolvidos no processo.

Ainda há que se considerar a possibilidade de que o transporte dos derivados glicosilados do ácido elágico para o interior das células MDA-MB-231 esteja sendo realizado pelos transportadores de glucose, uma vez que é relatado a capacidade de substâncias ligadas a moléculas de açúcar serem internalizadas por meio dos transportadores de glucose e exercerem efeito seletivo sobre as células tumorais, visto que é sabido que as células de câncer apresentam uma expressão aumentada de transportadores de glucose a fim de atender a demanda energética elevada devido à alta taxa proliferativa (WARBURG, 1956; CALVARESI; HERGENROTHER, 2013). Particularmente no câncer de mama tem-se observado a expressão aumentada dos receptores de glucose (GLUT-1) em comparação com o tecido mamário normal (KRZESLAK et al., 2012).

Nossos resultados, aliados a identificação das substâncias presentes nos extratos *L. pacari*, demonstram claramente que parte dos mecanismos envolvidos com os efeitos citotóxico/antiproliferativos provocados por esta espécie está relacionada com a ação do ácido elágico proveniente da hidrólise dos elagitaninos. Entretanto, sugere-se que existam outros mecanismos intra e extracelular envolvido, uma vez que alguns dos elagitaninos e demais componentes detectados nos extratos apresentam correlação com a atividade citotóxica frente a células MDA-MB-321. Além do mais, pelo fato do extrato de *L. pacari* ser quimicamente complexo alguns compostos ainda não foram identificados e podem ser responsáveis por esses efeitos.

Entretanto, é digno de nota, que os efeitos citotóxicos promovidos pelos elagitaninos têm sido associados as suas características químicas, como o número de grupos hidroxifenólicos (resíduos galoil e HHDP), atividade antioxidante e a ciclização ou não da cadeia poliol central (FERNANDES et al., 2009). Nesse trabalho foi demonstrado que o efeito antitumoral dos elagitaninos deve-se à sua hidrólise originando ácido elágico, portanto, os elagitaninos podem ser definidos como moléculas precursoras dos efeitos citotóxico/antiproliferativos.

No que se refere aos mecanismos de ação envolvidos com os efeitos citotóxico/antiproliferativos dos elagitaninos e do ácido elágico, estudos demonstram

que o ácido elágico e a punicalagina atuam por mecanismos intracelulares semelhantes, inibindo a proliferação, parando o ciclo celular na fase S, atuando na regulação das ciclinas e induzindo a morte de células de diferentes linhagens tumorais por apoptose, atuando de forma seletiva, não induzindo a morte de células não tumorais (LOSSO et al., 2004; LARROSA; TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2006; OMAR et al., 2016).

O estudo da diferença de expressão de OATp's e receptores de glucose entre o tecido normal e tumoral, bem como o mecanismo de internalização, metabolização e quantificação dos componentes do extrato são necessários a fim de avaliar a relação com o efeito e a captação seletiva de extrato de *Lafoensia pacari* observado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os 19 extratos de *L. pacari* obtidos pela combinação de 4 diferentes solventes são quimicamente semelhantes, variando apenas na área dos picos referentes aos compostos;
- Foram identificadas 20 substâncias nos extratos de *L. pacari*, incluindo taninos hidrolisáveis, derivados do ácido elágico, saponinas e triterpenos;
- A linhagem MDA-MB-231 é mais sensível que a linhagem MCF-7 à maioria dos extratos de *L. pacari*;
- Para as linhagens tumorais de mama tratadas com extrato E-2, as menores concentrações demonstraram exercer efeito antiproliferativo, e as mais elevadas indicam um efeito citotóxico;
- O extrato E-2 (metanol:etanol 50% v/v) apresentou maior seletividade para ambas as linhagens analisadas visualizadas pelo método do MTT e confirmada pelo ensaio clonogênico.
- Ensaios que avaliam a proliferação celular por um tempo mais prolongado demonstraram que o E-2 (metanol:etanol) é mais seletivo que os demais extratos, por exercer um menor efeito sobre a inibição da capacidade proliferativa das células normais;
- Apesar das correlações de composição-efeito não apresentarem significância estatística, devido à similaridade entre os extratos, sugere-se que as substâncias como o ácido elágico, isômero de ácido hexosil elágico, isômero de pedunculagina, ácido O-galoil-deoxihexosil elágico e ácido deoxihexosil elágico estejam relacionadas com o efeito citotóxico/antiproliferativo sobre MDA-MB-231, e triterpeno, isômero de punicalagina, catequina, elagitanino e saponina estejam relacionados com o efeito sobre MCF-7;
- O estudo de correlação composição-efeito sugere que HHDP-O-hexosídeo, isômero de pedunculagina, isômero de punicalagina, O-galoil punicalina, ácido O-pentosil elágico e ácido O-deoxihexosil O-metil elágico, elagitanino e triterpeno estejam relacionados com o efeito seletivo dos extratos, estando presentes em maior concentração no extrato E-2 em comparação aos extratos E-3 e E-4.

- O extrato E-2 foi internalizado pela célula tumoral (MDA-MB-231), mas não pela célula normal, sendo possível a observação de produtos do metabolismo do ácido elágico no meio de cultura das células tumorais;
- É possível inferir que o metabolismo celular relativo aos componentes do extrato E-2 esteja relacionado com o efeito seletivo dos extratos sobre as células tumorais (MDA-MB-231), uma vez que os experimentos demonstraram que as células normais (McCoy) parecem não ter a capacidade de produzir e/ou secretar estes metabólitos;
- A ação antitumoral dos extratos das cascas de *L. pacari* não deve ser atribuída apenas ao ácido elágico, e sim a mistura de outras substâncias presentes no extrato;
- Conclui-se que o sistema solvente metanol:etanol foi o mais eficiente para extrair os compostos de *L. pacari* com atividade citotóxica seletiva sobre células de câncer de mama.

REFERENCIAS

- ABDULLA, Rahima et al. Qualitative Analysis of Polyphenols in Macroporous Resin Pretreated Pomegranate Husk Extract by HPLC-QTOF-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 465-473, 2017.
- ABUBAKAR, A. N. F.; ACHMADI, S. S.; SUPARTO, I. H. Triterpenoid of avocado (*Persea americana*) seed and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and liver HepG2 cancer cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 397-400, 2017.
- ALAM, F.; SAQIB, Q. N.; WAHEED, A. Cytotoxic activity of extracts and crude saponins from *Zanthoxylum armatum* DC. against human breast (MCF-7, MDA-MB-468) and colorectal (Caco-2) cancer cell lines. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 368-377, 2017.
- AMBIGAIPALAN, Priyatharini; DE CAMARGO, Adriano Costa; SHAHIDI, Fereidoon. Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 64, n. 34, p. 6584-6604, 2016.
- ANDERS, C. K.; CAREY, L. A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. **Clinical breast cancer**, v. 9, Supl. 2, S73-81, 2009.
- ÁRVORES DO BIOMA CERRADO. **Lafoensia pacari A.St.-Hil.** 2019. Disponível em: <<http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/06/20/lafoensia-pacari-a-st-hil/>>. Acesso em 09/11/18.
- ASHOUR, F. et al. Estrogen receptor positive breast tumors resist chemotherapy by the overexpression of P53 in Cancer Stem Cells. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 30, n. 2, p. 45-48, 2018.
- AQIL et al. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. **Food Research International**, v. 49, p. 345-353, 2012.
- BADISA, R. B. et al., Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Res**, v. 29 n. 8, p. 2993-2996, 2009.
- BALA, I. et al. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 40, n. 1, p. 206-210, 2006.
- BANA, E.; BAGREL D. In Vitro Breast Cancer Models as Useful Tools in Therapeutics? In: MEHMET GUNDUZ. **Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis**. InTech, 2011. Cap. 2, p. 21-38. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/breast-cancer-focusingtumor-microenvironment-stem-cells-and-metastasis/in-vitro-breast-cancer-models-as-useful-tools-intherapeutics>>. Acesso em: 15/01/2019.

BANASIAK, D. et al. Comparison between the Clonogenic, MTT, and SRB Assays for Determining Radiosensitivity in a Panel of Human Bladder Cancer Cell Lines and a Ureteral Cell Line. **Radiation Oncology Investigations**, v. 7, n. 2, p. 77–85, 1999.

BARREIRA, S. et al. Efeito de diferentes intensidades de corte seletivo sobre a regeneração natural de cerrado. **Cerne**, v. 6, n. 1, p. 40-51, 2000.

BATISTA, H. L. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas do estado do Tocantins. 152p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Clínica, UFC, 2008.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 21, n. 6, p. 167-223, 2000.

BOYD, M. R. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. In: **Anticancer Drug Development Guide**. Humana Press, Totowa, NJ, 1997. p. 23-42.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 6, p.1359-1369, 2010.

BRENTON, J. D. et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application. **J Clin Oncol.**, v. 23 n. 29, p. 7350-7360, 2005.

CALANI, Luca et al. Ultra-HPLC–MS n (poly) phenolic profiling and chemometric analysis of juices from ancient Punica granatum L. cultivars: A nontargeted approach. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 23, p. 5600-5609, 2013.

CALDERÓN-MONTAÑO J. M. et al. Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. **BioMed Research International**, v. 2014, 9 p., 2014.

CALVARESI, E. C.; HERGENROTHER, P. J. Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer. **Chemical science**, v. 4, n. 6, p. 2319-2333, 2013.

CAMPLING, B. G. et al. Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. **British journal of cancer**, v. 63, n. 1, p. 75, 1991.

CARNEIRO, C. C. et al. Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of Lafoensia pacari A. St.-Hil. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 310, p. 1-8, 2016.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ-SPI, 1994.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.

CHAVEZ, K. J.; GARIMELLA, S. V.; LIPKOWITZ, S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. **Breast disease**, v. 32, n. 1-2, p. 35-48, 2010.

CHEN, H. S. et al. Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF- β /Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 4, p. 1730-1738, 2015.

CIRQUEIRA, M.B. et al. Subtipos moleculares de câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 10, p.499-503, 2011.

COELHO, F. B. R. Levantamento Etnofarmacológico Realizado Na Comunidade Mumbuca Localizada No Jalapão–TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Supl. v. 2, p. 52-55, 2005.

DAI, X. et al. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3131-3141, 2017.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística Sem Matemática para Psicologia**. 7ª ed. São Paulo: Penso Editora, 2018.

DEORE, S. L.; KHADABADI, S. S. Antiproliferative activity of saponin fractions of *Chlorophytum borivilianum*. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 16, p. 33-37, 2010.

DESAI, T. H.; JOSHI, S. V. Anticancer activity of saponin isolated from *Albizia lebbeck* using various in vitro models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 231, p. 494-502, 2019.

DIKMEN; OZTURK, N.; OZTURK, Y. The Antioxidant Potency of *Punica granatum* L. Fruit Peel Reduces Cell Proliferation and Induces Apoptosis on Breast Cancer. **J Med Food**, v. 14, n. 12, p. 638–1646, 2011.

EBADA, S. S. et al. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. **Nature protocols**, v. 3, n. 12, p. 1820-1831, 2008.

EISINGER, F. et al. Mutations at BRCA1: the medul-lary breast carcinoma revisited, **Cancer Res.** v. 58, n. 8, p.1588-1592, 1998.

FERNANDES, A. et al. Antioxidant and biological properties of bioactive phenolic compounds from *Quercus suber* L. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 23, p. 11154-11160, 2009.

FERNANDES, M. R. et al. Carposeminal biometrics and germination of *Lafoensia pacari* A. St. Hil.(Lythraceae) exposed to different concentrations of GA3. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6Supl1, p. 2571-2584, 2012.

FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v. 24, p. 85-89, 2002.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v. 18, n. 1, p. 115-146, 2009.

FIRMO, W. et al. Caracterização do “estado da arte” de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae). **Natureza on line**, v. 14, n. 1, p. 012-022, 2016.

FISCHER, U. A. et al., Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. **Food chemistry**, v. 127, n. 2, p. 807-821, 2011.

FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Flora do Brasil 2020 under construction**. 2018. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8784>>. Acesso em 09/11/2018.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

GALDINO, P. M. et al. Antidepressant-like effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 581-585, 2009.

GALDINO, Pablinny Moreira et al. Central activities of hydroalcoholic extract from *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. stem bark. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 455-462, 2010.

GALDINO, P. M. *Lafoensia pacari* A. St. Hil: Identificação de constituintes ativos e avaliação da atividade antidepressiva. Tese de Doutorado, Programa Pós-Graduação em Farmacologia, UFSC, 2015.

GALVÃO, A. P. M. Dedaleiro, *Lafoensia pacari*. Espécies arbóreas brasileiras, **Embrapa**, 2017.

GUIMARÃES, H. A. et al. Effects of ethanolic extract of leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae (*pacari*), in pain and inflammation models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 328-333, 2010.

GRETARSDOTTIR, S. et al. BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability, **Cancer Res.** v. 58, n. 5, p.859-862, 1998.

GRIMES, K.I L. et al. Enhancing the Cancer Cell Growth Inhibitory Effects of Table Grape Anthocyanins. **Journal of food science**, v. 83, n. 9, p. 2369-2374, 2018.

HANAHAN D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674.

HASLAM E. Preface. In: QUIDEAU, S. **Chemistry and biology of ellagitannins: an underestimated class of bioactive plant polyphenols**. World Scientific, 2009.

HOLANDA, C. M. C. X. et al., Effect of paclitaxel (Taxol®) on the biodistribution of sodium pertechnetate ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) in female Wistar rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p.191-196, 2008.

HOLLIDAY, D. L., e SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast cancer research**, v. 13, n. 4, p. 1-7, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ministério da Saúde. **Estimativa 2018 Incidência de Câncer no Brasil**. 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 05/03/2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ministério da Saúde. **O que é o câncer**. 201-. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 10/10/2017.

JÄNICKE, R. U. et al. Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 16, p. 9357–9360, 1998.

JESUS, N. Z. T. Levantamento etnobotânico e triagem antiúlcera e antiedematogênica de plantas medicinais do distrito de pirizal-mt: avaliação da atividade antiúlcera do extrato metanólico de *Vatairea macrocarpa* (benth.) Ducke. Dissertação de mestrado, Programas de Pós-graduação em Medicina, da Faculdade de Ciências Médicas, UFMT, 2007.

KIM, H. et al. Ellagic acid shows different anti-proliferative effects between the MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines. **Journal of Breast Cancer**, v. 12, n. 2, p. 85-91, 2009.

KOCH, A. et al. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 95-99, 2005.

KONAN, N. A. et al. Cytotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cell lines. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 64, n. 5, p. 435-440, 2012.

KRZESLAK, A. et al. Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers. **Pathology & Oncology Research**, v. 18, n. 3, p. 721-728, 2012.

KUMAR V.; ABBAS, A. K.; ASTER, I. C. **Robbins, Patologia básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LAHLOU, M. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, n. 3A, p. 17-31, 2013.

LARROSA, M.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 17, n. 9, p. 611-625, 2006.

LARROSA, M. et al. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. **Molecular aspects of medicine**, v. 31, n. 6, p. 513-539, 2010.

LEE, A. V.; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N. E. MCF-7 cells — Changing the course of breast cancer research and care for 45 years. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 7, p. 1-4, 2015.

LIMA, M. C. Efeitos antiproliferativos de extratos de *Jodina Rhombifolia* Hook. Et Arn. e de *Carapa Guianensis* Aubl. em cultivo “in vitro” da linhagem celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano, 75 f. Monografia de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

LIMA, M. R. et al. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 300-306, 2006.

LIPÍŃSKA, L.; KLEWICKA, E.; SÓJKA, M. Structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. **Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria**, v. 13, n. 3, p. 289-299, 2014.

- LOSSO, J. N. et al. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 15, n. 11, p. 672-678, 2004.
- LUPI, M. et al. Cytostatic and cytotoxic effects of topotecan decoded by a novel mathematical simulation approach. **Cancer research**, v. 64, n. 8, p. 2825-2832, 2004.
- MARCONDES, D. B. da S. et al. Citotoxicity and apoptogenic effects of *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 243-250, 2014.
- MARTÍNEZ-LACACI, I. et al., Tumour cells resistance in cancer therapy. **Clin. Transl. Oncol.**, v. 9, n. 1, p.13-20, 2007.
- MAO, X. et al. Transport of corilagin, gallic acid, and ellagic acid from Fructus phyllanthi tannin fraction in Caco-2 cell monolayers. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.
- MATOS, L. G. et al. Anti-Inflammatory, Antinociceptive, and Sedating Effects of *Lafoensia pacari*. Aqueous Extract. **Pharmaceutical biology**, v. 46, n. 5, p. 341-346, 2008.
- MCGAHON, A. J. et al. Chapter 9: The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro. In: SCHWARTZ, L. M.; OSBORNE, B. A. (Ed.) **Methods in Cell Biology Vol. 46**, Academic Press, 1995. p. 153-185.
- MELO, et al. Medicinal plants used as antitumor agentes in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2001, 14 p., 2011.
- MENA, P. et al. Rapid and comprehensive evaluation of (poly) phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSn. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14821-14840, 2012.
- MIRZAPUR, P. et al. Apoptosis induction in human breast cancer cell lines by synergic effect of raloxifene and resveratrol through increasing proapoptotic genes. **Life Sci.**, v. 205, p. 45-53, 2018.
- MISHRA, T. et al. Isolation, characterization and anticancer potential of cytotoxic triterpenes from *Betula utilis* bark. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0159430, 2016.
- MOTA MENEZES, V. et al. Assessing the Therapeutic Use of *Lafoensia pacari* St. Hil. Extract (Mangava-Brava) in the Eradication of *Helicobacter pylori*: Double-Blind Randomized Clinical Trial. **Helicobacter**, v. 11, n. 3, p. 188-195, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983.
- MUKHERJEE, A. K. et al. Advances in cancer therapy with plant based natural products. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1467-1486, 2001.
- MÜLLER, V. et al. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytother Res**, v. 21, p. 970-974, 2007.

MUNDO, S. R.; DUARTE, M. R. Morfoanatomia foliar e caulinar de dedaleiro: *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 3, p. 522-529, 2007.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic cell survival assay. In: BLUMENTHAL R.D (Ed.) **Chemosensitivity**. Humana Press, 2005. p. 21-28.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **What is cancer**. 2015. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 13/11/2017.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Cancer treatment Research**. 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/research/areas/treatment>>. Acesso em 10/10/2017.

NASCIMENTO, Marcus Vinícius Mariano et al. Antinociceptive effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. independent of anti-inflammatory activity of ellagic acid. **Journal of natural medicines**, v. 65, n. 3-4, p. 448-454, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger 7ª ed.** Porto Alegre: Artmed Editora, 2018.

GOMES, M.A. N.; SHEPHERD, S.L.K. Estudo de nutrição mineral in vitro relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado. **Braz. J. Bot.**, v. 23, p. 153-159, 2000.

OBAIDAT, A.; ROTH, M.; HAGENBUCH, B. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 52, p. 135-151, 2012.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OMAR, U. et al. Effect of Punicalagin on Human Colon Cancer Caco-Cells. **Malaysian Journal of Nutrition**, v. 22, n. 1, 2016.

PAPOUTSI, Z. et al. Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ER α and ER β . **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7715-7720, 2005.

PASA, M, C.; CABRAL, P. R. F. Mangava-brava: *lafoensia pacari* a. st.-hil.(lythraceae) e a Etnobotânica em Cuiabá, MT. **Biodiversidade**, v. 8, n. 1, p. 2-21, 2009.

PEREIRA, L. O. M. et al. *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.: Wound healing activity and mechanism of action of standardized hydroethanolic leaves extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 219, p. 337-350, 2018.

PORFÍRIO, Z. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Rev bras farmacogn**, v. 19, p. 785-789, 2009.

RAYAN, A.; RAIYN, J.; FALAH, M. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. **PloS one**, v. 2, n. 11, p. 1-12, 2017.

REICHERT, C. L. Estudo químico e biomonitorado de extratos e frações de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., sobre células de carcinoma de cólon HRT-18 e leucêmica U-937. 123 f. Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPR, 2018.

REICHERT, C. L. et al. Metabolic profiling and correlation analysis for the determination of killer compounds of proliferating and clonogenic HRT-18 colon cancer cells from *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 541–552, 2018.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125, 2008.

RIBEIRO, J. T. et al. Cytotoxic drugs for patients with breast cancer in the era of targeted treatment: back to the future? *Annals of Oncology*, v. 23, n. 3, p. 547-555, 2011.

RISS, T. L. et al. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. In: STODDART, M. J. (Ed.), **Mammalian Cell Viability**. Humana Press, 2011. p. 103-114.

RIXE, O.; FOJO, T. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytotaxis sufficient? **Clinical cancer research**, v. 13, n. 24, p. 7280-7287, 2007.

ROGÉRIO, A. P. et al. *Lafoensia pacari* extract inhibits IL-5 production in toxocariasis. **Parasite immunology**, v. 25, n. 7, p. 393-400, 2003.

ROGÉRIO, A. P. et al. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 9, p. 1265-1273, 2006.

ROTH, M.; OBAIDAT, A.; HAGENBUCH, B.. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 5, p. 1260-1287, 2012.

SAMPAIO, B. L. et al. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1127-1137, 2011.

SANDHU, R. et al. Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. **LabMedicine**, v. 41, n. 6, p. 364-372, 2010.

SANTOS, A. F. Estudo do efeito antitumoral da fração de alcaloides totais isolada de *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC., Apocynaceae e desenvolvimento e validação de software de mensuração de área e contagem de número de colônias. 114 f. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPR, 2018.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. Foliar flavonoids of *Lafoensia* (Lythraceae). **Biochemical systematics and ecology**, v. 28, n. 5, p. 487-488, 2000.

SANTOS L. W. Estudos ecológicos e agrônômicos de *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae) na região de Barra do Garças-MT. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, UFMG, 2006.

SANTOS, L. W.; COELHO, M. F. B.; PIRANI, F. R. Fenologia da *Lafoensia pacari* A.St-Hil. (Lythraceae) em Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil. **Rev. Bras. Plantas med.**, v. 11, n. 1, p. 12-17, 2009.

SILVA JUNIOR, I. F. et al. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.3, p. 422-428, 2010.

SOLON, S. et al. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 173-178, 2000.

SONG, Y. H. et al. Plant-derived natural products as leads to anti-cancer drugs. **J Med Plant Herb Ther Res**, v. 2, p. 6-15, 2014.

SOUZA, C. D.; FELFILI, Jeanine Maria. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p.308-312, abr. 2004.

STEIN, W. D. et al. Low and high concentrations of the topo II inhibitor daunorubicin in NIH3T3 cells: reversible G2/M versus irreversible G1 and S arrest. **Cell Cycle**, v. 2, n. 2, p. 135-143, 2003.

STRATI, A. et al. Effect of ellagic acid on the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) $\alpha+$ $\beta+$ transcript in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. **Clinical biochemistry**, v. 42, n. 13-14, p. 1358-1362, 2009.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: HOSTETTMANN K, (ed.). **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**. London: Academic Press, 1990. p. 71-133.

TAMASHIRO-FILHO, P. Avaliação da atividade antiúlcera do extrato bruto metanólico de *Lafoensia pacari* St. Hil. (mangava-brava). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Federal de Mato Grosso, 1999.

TAMASHIRO FILHO, P. et al. Evaluation of antiulcer activity and mechanism of action of methanol stem bark extract of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lytraceae) in experimental animals. **J Ethnopharmacol**, v. 144, p. 497-505, 2012.

TOY, W. et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. **Nature genetics**, v. 45, n. 12, p. 1439-1445, 2013.

WANG et al., Effect of *Sanguisorba officinalis* L on breast cancer growth and angiogenesis. **Expert Opin. Ther. Targets**, v.16 p. 79-89, 2012.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.

WHITLEY, A. C. et al. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid—extensive binding to protein and DNA. **Biochemical pharmacology**, v. 66, n. 6, p. 907-915, 2003.

WHITLEY, A. C.; SWEET, D. H.; WALLE, T. Site-specific accumulation of the cancer preventive dietary polyphenol ellagic acid in epithelial cells of the aerodigestive tract. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 9, p. 1201-1209, 2006.

WLCEK, K. et al. Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma. **Cancer biology & therapy**, v. 7, n. 9, p. 1450-1455, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The top 10 causes of death**. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 14/11/2017.

YANG, S.; ZHOU Q.; YANG, X. Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1773, p. 903–911, 2007.

YU, W. S. et al. The genome-wide expression profile of 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- β -D-glucose-treated MDA-MB-231 breast cancer cells: molecular target on cancer metabolism. **Molecules and cells**, v. 32, n. 2, p. 123-132, 2011.

ZUCKER, W. V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **The American Naturalist**, v. 121, n. 3, p. 335-365, 1983.